

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Medizinische Klinik III
Abteilung für Hämatologie und Onkologie

**„Untersuchungen zum Metabolismus und
zur Apoptoseinduktion
von Purinanaloga und Pyrimidinanaloga in
myeloischen und lymphatischen Zellen“**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin
der Johann Wolfgang Goethe Universität

Frankfurt am Main

Vorgelegt von
Simone Napieralski

Frankfurt am Main

Dekan: Prof. Dr. Josef Pfeilschifter
Referent: Prof.Dr. Paris S. Mitrou
Koreferent: Prof. Dr. Christian Fellbaum

Tag der mündlichen Prüfung: 13.01.2004

Gliederung

1.	Einleitung und Fragestellung	1
2.	Apoptose.....	4
2.1.	Apoptosemechanismen	4
2.1.1.	Die Initiierungsphase der Apoptose	4
2.1.2.	Aktivierung der Mitochondrienebene durch Bid.....	6
2.1.3.	Die Funktion der Mitochondrien bei der Apoptose.....	7
2.1.4.	Die Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) Familie	8
2.1.5.	Die Rolle der Caspasenfamilie beim programmierten Zelltod	10
2.1.6.	Die Caspaseninhibitoren	12
3.	Zytostatika	13
3.1.	Purin- und Pyrimidinanaloga	13
3.1.1.	Cladribin (2-Chloro-2'-deoxy- β -D-adenosin, 2-CdA)	14
3.1.1.1.	Wirkmechanismus	14
3.1.1.2.	Unerwünschte Wirkungen.....	15
3.1.2.	Gemcitabin (2',2'-difluorodeoxycytidin, dFdC).....	16
3.1.2.1.	Wirkmechanismus	16
3.1.2.2.	Unerwünschte Wirkungen.....	18
3.1.3.	Cytarabin (1- β -D-arabinofuranosylcytosine, Ara-C)	18
3.1.3.1.	Wirkmechanismus	18
3.1.3.2.	Unerwünschte Wirkungen.....	19
3.1.4.	Fludarabin (9- β -D-arabinosyl-2-fluoroadenine, F-ara-A)	20
3.1.4.1.	Wirkmechanismus	20
3.1.4.2.	Unerwünschte Wirkungen.....	21
3.1.5.	Bendamustin.....	22
3.1.5.1.	Wirkmechanismus	22
3.1.5.2.	Unerwünschte Wirkungen.....	23
4.	Material und Methoden.....	24
4.1.	Materialien	24
4.1.1.	Reagenzien	24
4.1.2.	Radiochemikalien	25
4.1.3.	Zytostatika	25
4.1.4.	Zelllinien	25
4.1.5.	Arbeitsmaterialien	26
4.1.6.	Software	27
4.1.7.	Proliferationsassay.....	27
4.1.8.	Rezepte für den Western Blot	27
4.1.9.	Primär-Antikörper	29
4.1.10.	Sekundär-Antikörper	29
4.2.	Inkubationsschemata	30
4.2.1.	Inkubationsschemata der Zytostatika bei der HPLC-Messung.....	30
4.2.2.	Inkubationsschemata der Zytostatika bei der Apoptosemessung und der Messung des Zusammenbruchs des mitochondrialen Membranpotentials	30
4.2.3.	Combinations-Index Methode ^{33,34}	31
4.2.3.1.	2-CdA: Stammlösung 1 mg/ml.....	32
4.2.3.2.	Ara-C: Stammlösung 100 mg/ml.....	32
4.2.3.3.	Fludarabin: Stammlösung 1 mg/ml	33

4.2.3.4.	Bendamustin: Stammlösung 1 mg/ml	33
4.2.3.5.	Ara-C: Stammlösung 100 mg/ml	33
4.2.3.6.	Fludarabin: Stammlösung 1 mg/ml	34
4.2.3.7.	Bendamustin: Stammlösung 1 mg/ml	34
4.2.4.	Inkubationsschemata der Zytostatika für die Proliferationsassays	34
4.2.5.	Dosierungen für die Analyse der apoptoserelevanten Proteine	35
4.3.	Methoden	36
4.3.1.	Zellseparation nach Ficoll-Hypaque	36
4.3.2.	Zellzahlbestimmung	36
4.3.3.	Kultur von Zelllinien	37
4.3.4.	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	37
4.3.4.1.	Die Pumpe	38
4.3.4.2.	Die Gradientensysteme	38
4.3.4.3.	Die Probenaufgabensysteme	39
4.3.4.4.	Die Säule	39
4.3.4.5.	Die mobile Phase	40
4.3.4.6.	Zusammensetzung der mobilen Phase	42
4.3.4.7.	Der Detektor	42
4.3.4.8.	Die Probenvorbereitung	42
4.3.5.	Analyse der Apoptoserate mit 7-AAD am FACScan Durchflußzytometer	43
4.3.5.1.	Vorbereitung zum Messen	44
4.3.5.2.	Durchflußzytometrie	44
4.3.6.	Analyse der Apoptoserate mit JC-1 am Durchflußzytometer	46
4.3.7.	Analyse der Apoptoserate mit Annexin am Durchflußzytometer	47
4.3.8.	XTT-Assay	48
4.3.9.	MTT-Assay	49
4.3.10.	Western Blot	49
4.3.10.1.	Vorbereitung der Proben	50
4.3.10.2.	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	51
4.3.10.3.	Gele gießen	52
4.3.10.4.	Western Blotting	53
4.3.10.5.	Bindung des primären Antikörpers an das Zielprotein	54
4.3.10.6.	Entwicklung der Blots unter Verwendung chromogener Substrate mit Enzym gekoppelten Antikörpern	54
4.3.10.7.	Entfärben der Gele	55
5.	Ergebnisse der Experimente	56
5.1.	Beeinflussung des intrazellulären Metabolismus von 2-CdA durch Gemcitabin in Zelllinien	56
5.2.	Intrazellulärer Metabolismus von 2-CdA in mononukleären Zellen	61
5.3.	Einfluss verschiedener Zytostatika auf die Apoptoserate, verabreicht als Einzelsubstanz und in Kombination	63
5.3.1.	Ergebnisse der Einzelsubstanzen	63
5.3.2.	Ergebnisse der Medikamentenkombinationen	67
5.4.	Bestätigung der Apoptosemessung am FACScan-Durchflußzytometer mit Annexin und Bestimmung des Zusammenbruchs des Mitochondrienmembranpotentials mit JC-1 ...	72
5.5.	Messung der Proliferationsrate mit dem MTT-Assay	78
5.6.	Ergebnisse der Western Blots	81
6.	Diskussion	85
6.1.	Induktion des programmierten Zelltodes durch 2-CdA alleine oder in Kombination mit Gemcitabin	85

6.2.	Induktion der Apoptose durch Ara-C alleine und in Kombination mit verschiedenen Purinanaloga.....	89
6.3.	Einfluss der Medikamentenkombinationen auf die Expression apoptoserelevanter Proteine	94
7.	Zusammenfassung:	96
8.	Summary	98
9.	Literatur:	100
10.	Schriftliche Erklärung	106
11.	Lebenslauf	107
12.	Danksagung	109

1. Einleitung und Fragestellung

Purinanaloga und Pyrimidinanaloga repräsentieren eine vielversprechende Familie von Antitumor Substanzen in der Behandlung hämatologischer Erkrankungen. Hauptmechanismus der zytostatisch wirksamen Medikamente ist zum einen die Induktion der Apoptose und zum anderen die Inhibition der Zellproliferation, was beides letztendlich zum Untergang der Zelle führt und damit zur Tumorregression. Nukleosidanaloga ahmen physiologische Nukleoside bezüglich der Aufnahme und des Metabolismus nach, des weiteren werden sie in neu synthetisierter DNS eingebaut, was zur Synthesehemmung und zum Kettenabbruch führt.¹ All diese Effekte resultieren am Ende im Untergang der Zelle. Der entscheidende Schritt dabei ist die Induktion des programmierten Zelltodes, der sogenannten Apoptose. Bei der Apoptose handelt es sich um eine klar im Ablauf festgelegte Zerstörung der Zelle. Dieser Ablauf ist für die normale Entwicklung von Geweben notwendig, um die Gewebshomöostase aufrechtzuerhalten. Der programmierte Zelltod spielt auch bei pathologischen Prozessen, z.B. bei Tumoren, eine entscheidende Rolle. Man ist sich heute darüber einig, daß der durch Zytostatika induzierte Tod normaler und neoplastischer Zellen über Apoptosemechanismen reguliert wird. Die Apoptose wird in drei Phasen unterteilt, die Initiierungsphase, in der über Rezeptorsysteme Signaltransduktionswege aktiviert werden, die Effektorphase oder Entscheidungsphase, die mit der Permeabilisierung der Mitochondrienmembran einhergeht, und in der die Zellzerstörung eingeleitet wird und die finale Phase, die als Exekution bezeichnet wird und deren Folge die Aktivierung und die Funktion der Caspasen, eine Familie von Cysteinproteasen, ist.² Bisher wurden zwei Wege beschrieben, die zum programmierten Zelltod führen. Der eine Weg beinhaltet die Interaktion eines Liganden mit seinem Todesrezeptor, z.B. dem TNF- α Rezeptor oder dem Fas Rezeptor. Der zweite Weg ist abhängig von der Teilnahme der Mitochondrien. Das Endresultat eines jeden Pfades ist die Caspasenaktivierung und die Spaltung spezifischer zellulärer Substrate, resultierend in morphologischen und biochemischen Änderungen der Zellen.³

In verschiedenen klinischen Studien wurde die klinische Wirksamkeit des Purinanalogs 2-Chlordeoxyadenosine (2-CdA) demonstriert, dabei wird es meistens als Einzelsubstanz verabreicht, Anwendung findet es bei der chronisch lymphatischen Leukämie⁴, bei der Haarzellleukämie und bei niedrigmalignen Lymphomen.²¹ Im ersten Teil dieser Arbeit soll zunächst die intrazelluläre Phosphorylierung des Cladribins in seine aktiven Metabolite 2-CdA-5'-mono-, di- und triphosphat in neoplastischen mononukleären Zellen von Patienten mit nied-

rigmaligen Lymphomen (CLL) und in mononukleären Zellen gesunder Probanden mit Hilfe der Hochflüssigkeitschromatographie untersucht werden.

In vielen etablierten Standardregimes zur Behandlung maligner hämatologischer Erkrankungen werden Purin- und Pyrimidinanaloga miteinander kombiniert (Fludarabin plus Ara-C, 2-CdA plus Ara-C^{6,7}), um zum einen die klinische Effektivität, sprich das Erreichen und den Erhalt kompletter Remissionen zu erhöhen und gleichzeitig die Toxizität zu senken.

Im zweiten Teil soll geprüft werden, ob sich die Effektivität des Chemotherapeutikums appliziert als Einzelsubstanz durch kombinieren mit einem zweiten Zytostatikum, z.B. einem Pyrimidinanalogon durch Beeinflussung seines intrazellulären Metabolismus erhöhen lässt.

Gemcitabin ist ein neues Pyrimidinanalogon, daß nicht nur als Einzelsubstanz sehr gute Ergebnisse erbracht hat, sondern auch vielversprechende Wirkungen mit anderen neoplastisch wirksamen Medikamenten gezeigt hat, so konnte von Gandhi et al⁸ demonstriert werden, daß dFdC als Modulator auf den Metabolismus anderer Nukleoside wirkt, vor allem auf diejenigen, die durch die Deoxycytidinkinase phosphoryliert werden, wie es z.B. beim 2-Chlorodeoxyadenosine der Fall ist. Gemcitabin könnte somit ein interessanter Kombinationspartner in der Behandlung neoplastischer Erkrankungen sein. Deshalb soll im weiteren der Einfluss von Gemcitabin auf den intrazellulären Metabolismus bzw. auf die intrazelluläre Phosphorylierung des 2-Chlorodeoxyadenosine in seine aktiven Metabolite in myeloischen (HEL, HL 60) und in lymphatischen Zelllinien (HUT 78, JURKAT) mit der Hochflüssigkeitschromatographie analysiert werden. Dabei sollen eventuelle Unterschiede zwischen sequentieller und gleichzeitiger Applikation erfasst werden.

Wie oben schon erwähnt, werden Purin- und Pyrimidinanaloga in Standardregimes erfolgreich miteinander kombiniert. Jüngste Beobachtungen haben gezeigt, daß Ara-C den zytotoxischen Effekt anderer Substrate steigern kann, da es die Sensibilität für die Deoxycytidinkinase erhöht. Auch Gandhi et al^{6,9,10} haben in verschiedenen Studien die Kombination von Ara-C mit anderen Purin- und Pyrimidinanaloga untersucht. So konnte z.B. gezeigt werden, daß die Dauer der kompletten Remissionen durch die Kombination von Ara-C mit Fludarabin signifikant verlängert werden konnte. Untersucht wurde bisher jedoch nur der Metabolismus dieser Standardregimes. Auch wurde die Korrelation zwischen Apoptoseinduktion und Zellproliferation noch nicht geprüft. Im dritten Teil der Arbeit soll daher die Kombination von Ara-C mit Fludarabin bezüglich der Induktion der Apoptose, des Einflusses auf die Zellproliferation und der Expression apoptoserelevanter Proteine analysiert werden. Da Cladribin ein potenterer Hemmer der Ribonukleotidreduktase ist als Fludarabin und zu einer höheren Akkumulationsrate von Ara-CTP führt, wird auch diese Medikamentenkombination untersucht. Interessante

Effekte könnten sich durch die Kombination von Ara-C mit Bendamustin ergeben. Bendamustin ist eine neue Substanz, die zur Gruppe der bifunktionellen alkylierenden Substanzen gehört, es vereint sowohl die Eigenschaften eines Purinanalogs, als auch die Merkmale eines Alkylanz.

Die Induktion der Apoptose sowie der Zusammenbruch des Mitochondrienmembranpotentials durch die drei Medikamentenkombinationen sollen an zwei myeloischen Zelllinien (HEL und HL 60) mit der Durchflußzytometrie am FACScan evaluiert werden. Dabei sollen auch die Unterschiede zwischen einer sequentiellen und simultanen Applikation der Zytostatika erfasst werden. Der Einfluss auf die Zellproliferation wird mit sogenannten Zellproliferationssassays unter Verwendung eines Elisa Readers untersucht. Die Prüfung der Expression der apoptoserelevanten Proteine erfolgt mit Hilfe des Western Blots.

2. Apoptose

2.1. Apoptosemechanismen

Man unterscheidet zwei Formen des Zelltodes, die Nekrose und die Apoptose. Während bei dem Vorgang der Nekrose, ein passiver Zelltod, die Zellen durch bestimmte physikalische Noxen von außen rasch lysiert werden, kommt es bei der Apoptose, dem programmierten Zelltod, zu einer klar im Ablauf festgelegten Zerstörung der Zelle. Der programmierte Zelltod ist ein essentieller Prozess, der für die normale Entwicklung von Geweben nötig ist, um die Gewebshomöostase aufrechtzuerhalten. Er spielt aber auch bei pathologischen Vorgängen, z.B. bei Tumoren, eine entscheidende Rolle.³ Die Apoptose wird durch intrinsische zelluläre Mechanismen geregelt und kontrolliert.¹¹ Man ist sich heute darüber einig, daß der durch Zytostatika induzierte Tod normaler und neoplastischer Zellen über Apoptosemechanismen reguliert wird. Man unterteilt die Apoptose in drei Phasen, die Initiierungsphase, in der über Rezeptorsysteme Signaltransduktionswege aktiviert werden, die Effektor- oder Entscheidungsphase, die mit der Permeabilisierung der Mitochondrienmembran einhergeht und in der die Zellzerstörung eingeleitet wird und die finale Phase, die als Exekution bezeichnet wird, sie ereignet sich durch die Aktivierung und die Funktion der Caspasen, eine Familie von Cysteinproteasen.² Es gibt jedoch Abweichungen von dieser Phaseneinteilung. Es sind zwei Hauptwege bekannt, die zum apoptotischen Zelltod führen. Der eine Weg beinhaltet die Interaktion eines Liganden mit seinem Todesrezeptor, z.B. der TNF-1 Rezeptor oder der Fas Rezeptor. Der zweite Weg ist abhängig von der Teilnahme der Mitochondrien. Das Endresultat eines jeden Pfades ist die Caspasenaktivierung und die Spaltung spezifischer zellulärer Substrate, resultierend in morphologischen und biochemischen Änderungen der Zellen.³

2.1.1. Die Initiierungsphase der Apoptose

Das bekannteste Molekül, das den Apoptosevorgang initiiert, ist CD 95 (Apo-1, Fas). CD 95 ist ein Transmembranrezeptor, der zur Tumor Necrosis Factor/Nerve Growth Factor (TNF/NGF) Superfamilie gehört, die eine Vielzahl an Wachstums- und Differenzierungsvorgängen sowie an aktivierenden und inhibierenden Effekten auf Zellen ausüben. Aber nicht nur CD 95 ist dazu in der Lage auch andere Mitglieder der TNF Familie können die Apoptose

initiiieren, wie CD 120a (TNF-R1), DR3 (Wsl-I, Tramp), DR4 (Trail-R1), DR5 (Trail-R2) und CAR-1, sie werden auch als Todesrezeptoren bezeichnet.^{12,3} Der Rezeptor CD 95 (Fas) ist im

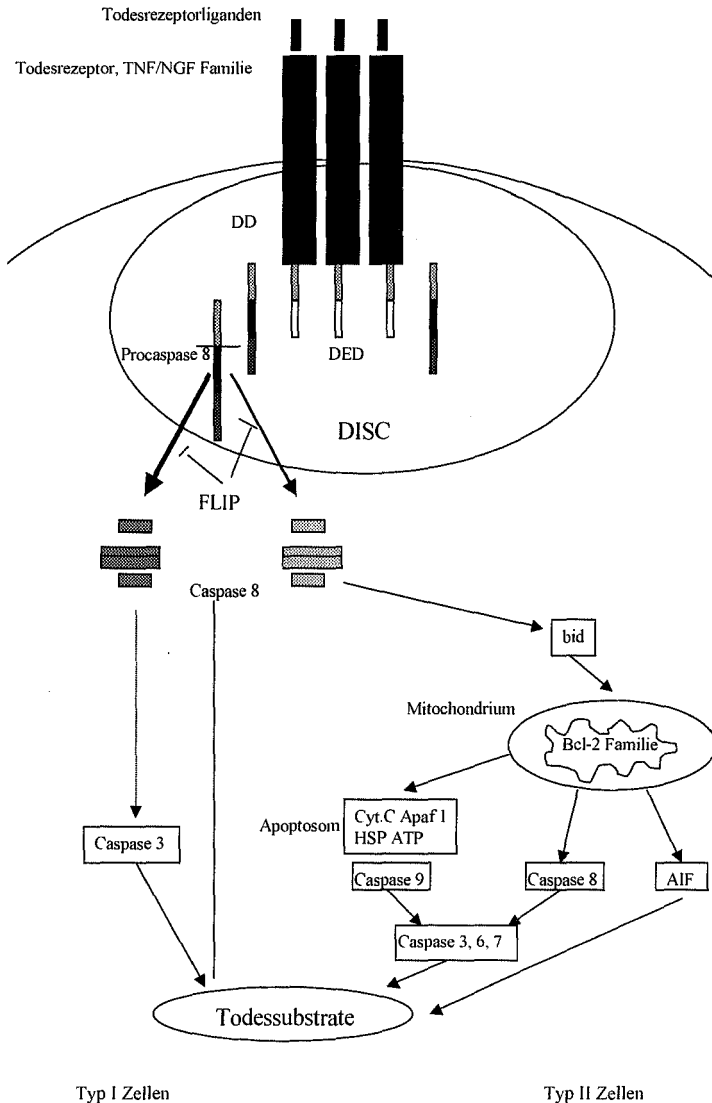


Abb.1: Vereinfachte, schematische Darstellung der bekannten Apoptosemechanismen, DD = Todesdomäne, DED = Todeseffektordomäne, Cyt. C = Cytochrom C, HSP = heat shock protein

Körper weitverbreitet und findet sich auf der Mehrzahl der menschlichen Zellen, wird aber auch auf vielen Tumoren expremiert.¹³ Werden diese Todesrezeptoren der Tumornekrosefaktorrezeptor Familie von ihren Liganden gebunden, kann die Apoptose ablaufen, durch die Bindung bildet sich auf der zytoplasmatischen Seite des Rezeptors ein Komplex von Proteinen aus, den man „Death inducing signalling complex“ oder kurz DISC nennt. Die Todesrezeptoren besitzen eine zytosolische Domäne, die sogenannte Todesdomäne, die sich auf der intrazellulären Seite des CD 95 Moleküls befindet.⁹ An diese binden zunächst die Todesdomänen der Adapterproteine wie FADD/MORT-1 (Fas associated death domain). Die FADD/Mort-1 Proteine beinhalten beide neben einer Todesdomäne (DD) eine additive Proteininteraktionsdomäne, die als Todeseffektordomäne bezeichnet wird, diese bindet homologe Domänen, wie die Prodomänen der Caspasen 8 und 10.¹² Diese Interaktion der Todeseffektordomänen von FADD mit der Procaspase 8 führt zur Rekrutierung der Letzteren in die DISC. Die katalytische Spaltung der Caspasen führt zur Abspaltung der DED (death effector domain) enthaltenen Prodomäne, dies führt zur Freisetzung der aktiven Protease in das Zytosol, wo es andere Proteasen spalten und aktivieren kann, dadurch wird zum einen die Caspasenkaskade in Gang gesetzt und zum anderen werden Signale an den mitochondrialen Apoptosekomplex vermittelt.^{3,12} Dabei unterscheidet man zwei Typen von Zellen, die Typ I Zellen initiieren die Apoptose über die Caspase 8 mit nachfolgender Aktivierung weiterer Caspasen innerhalb der Caspasenfamilie.¹¹ Die Typ II Zellen vermitteln die Signale durch Mitglieder der Bcl-2 Familie, speziell durch die Spaltung von Bid unter Einbeziehung der Mitochondrien.² Sogenannte FLIP Moleküle (Synonyme: FLAME, I-FLICE, Casper, CASH, MRIT oder CLARP) sind in der Lage die durch CD 95 (Fas) vermittelte Apoptose zu blockieren.³ Die FLIP Moleküle sind entweder viraler (v-FLIP) oder zellulärer Herkunft (c-FLIP). Sie und andere antiapoptotische DED Familien Mitglieder konkurrieren mit den Caspasen um die Bindung an FADD/Mort-1, sie fungieren somit als Inhibitoren der Caspasen, die an der Signalweiterleitung über die Rezeptoren der TNF Familie beteiligt sind.¹²

2.1.2. Aktivierung der Mitochondrienebene durch Bid

Bei Typ II Zellen ist die Übertragung von Signalen vom DISC zu den Mitochondrien abhängig von der Spaltung der Procaspase 8 zur aktiven Caspase 8, die dann Bid wiederum durch Spaltung aktiviert. Dadurch erfolgt die Translokation von Bid zu den Mitochondrien und führt

dort zur Freisetzung von Cytochrom C und dem Apoptosis-Inducing-Factor, meist durch Interaktion mit Bax oder Bak.^{3,14}

2.1.3. Die Funktion der Mitochondrien bei der Apoptose

Es sind drei Mechanismen bekannt wie Mitochondrien den Zelltod verursachen können. Erstens über die Spaltung des Elektronentransportes, die oxidative Phosphorylation und die ATP Produktion, zweitens über die Freisetzung von Proteinen, welche die Aktivierung der Caspasen triggern und drittens über die Änderung des zellulären Reduktions-Oxidationspotentials.¹⁴ Entscheidend für die Apoptoseregulationsmechanismen, die den Weg über die Mitochondrien beschreiten, ist die Depolarisation der Mitochondrienmembran. Dabei unterscheidet man zwei unterschiedliche Mechanismen, es gibt einmal einen schnellen Weg, der die über Apaf-1 verursachte Caspasenaktivierung beinhaltet und zum anderen einen langsamen Prozess, bei welchem es zum Kollaps des Elektronentransportes kommt, wenn Cytochrom C freigesetzt wird, was zu einer Freisetzung von toxischen Sauerstoffradikalen und zu einer Verminderung der ATP-Produktion führt.¹⁴ Im ersten Fall sind spezielle Regulationsmechanismen vorgeschaltet (CD 95, DISC, Bid), hier wird die Apoptose durch proapoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie, wie Bax oder Bak induziert.³ Voraussetzung für die Apoptose ist eine durch Depolarisation herbeigeführte Membranpermeabilisierung, die die Freisetzung von Cytochrom C und Apoptosis-Inducing-Factor (AIF) zur Folge hat, beides Proteine, die bei intakter Membran zwischen der äußeren und inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind.³ Antiapoptotische Proteine wie Bcl-2, Bcl-XL oder das onkogene Abl können das Mitochondrium gegen die Membranpermeabilisierung schützen.¹² Cytochrom c ist Bestandteil des sogenannten Apoptosoms, ein Schlüsselprotein, das im Mitochondrium an eine Hämgruppe gekoppelt wird, es entsteht das Holocytochrom C, nur diese Form des Cytochrom C kann die Caspasen Aktivierung induzieren.³ Dieses zytosolische Holocytochrom C bildet einen wichtigen Teil des Apoptosoms, welches aus Cytochrom C, Apaf-1 und Procaspase 9 besteht. Dieser Komplex hat die Aktivierung von Caspase 9 zur Folge, welche dann wiederum die nachgeschalteten Procaspasen 3, 6 und 7 spaltet und damit für die Aktivierung der entsprechenden exekutorischen- oder Effektorcaspase verantwortlich ist, womit der sogenannte „point of no return“ des programmierten Zelltodes eingeleitet wird. Die Cytochrom C Ausschüttung erfolgt aber nicht nur über die Bildung des Apoptosoms, sondern auch durch die Ligandenbindung an den Rezeptor der Tumornekroserezeptorfamilie Fas, bei welcher die

Freisetzung von Cytochrom C durch die Inhibierung der Caspasen durch Anbindung an die zytosolische Domäne des ligandengebundenen Fas erfolgt.¹⁴ Neben der Freisetzung spezieller Mediatoren, spielt auch der PT-Kanal („permeability Transition pore“) bei der Apoptose eine wesentliche Rolle. Während der Apoptose kommt es zum Zusammenbruch des Potentials der inneren Mitochondrienmembran, was zur Öffnung eines großen Kanals führt, der PT-Kanal.¹⁴ Er ist zusammengesetzt aus Proteinen der inneren Membran, Adennukleotidtranslokatoren (ANT) und aus Proteinen der äußeren Membran, sogenannte Porine (spannungsabhängige Anionenkanäle; VDAC), es kommt zum Kontakt zwischen der inneren und äußeren Membran und somit zur Bildung eines Kanals, der von Molekülen mit einer Größe unter 1,5 kD passiert werden kann.¹⁴ Diese Öffnung ermöglicht zum einen die Entkopplung der Atmungskette durch bestimmte Ionen, die den Kanal passieren können, zum anderen kommt es zu einer Dysregulation des Mitochondrienvolumens und dadurch zur Hyperosmolalität der Matrix.¹⁴ Die innere Membran mit den Cristae besitzt eine größere Oberfläche als die äußere Membran, deshalb führt eine Expansion des Matrixvolumens zur Ruptur der äußeren Membran, was eine Freisetzung der in dem intermembranösen Zytosol lokalisierten Caspase aktivierenden Proteinen zur Folge hat.¹⁴ Die Entstehung des PT kann beispielsweise durch Bcl-2 verhindert werden, während die ANT-Aktivatoren und Bax diesen und die Apoptose induzieren. Eine Hyperpolarisation der inneren Membran, die durch Bcl-XL suprimiert werden kann, kann ebenfalls zur Ruptur der äußeren Membran führen, so kann z.B. die Bindung von Rhodamine an den Fas Rezeptor die Hyperpolarisation bewirken.¹⁴ Wie oben erwähnt wird neben dem Cytochrom C auch der Apoptosis-Inducing-Factor (AIF) und das Protein Smac/Diablo aus den Mitochondrien freigesetzt. AIF wandert zum Zellkern und aktiviert dort die Nukleasen, er kann aber auch die Caspasenaktivierung bewirken, augenscheinlich ist er an der Spaltung von Procaspase 3 beteiligt.¹⁴ Das Protein Smac/Diablo fördert die Caspasenaktivierung durch Assoziation mit dem Apoptosom und durch Inhibierung der IAPs (Inhibitoren der Apoptoseproteine), so daß die Apoptose ablaufen kann.¹³

2.1.4. Die Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) Familie

Das Bcl-2 Gen wurde zuerst als Protoonkogen in folliculären B-Zell Lymphomen entdeckt, es ist auf Chromosom 18q21 lokalisiert. Anschließend wurde es als homologes Säugetiergen zu dem in *Caenorhabditis elegans* gefundenen ced-9 identifiziert, seitdem wurden 19 Mitglieder der Bcl-2 Familie in Säugetier Zellen identifiziert. Die Homologie dieser Proteine ist insge-

samt niedrig, sie ist jedoch durch vier Regionen, die BH (Bcl-2 Homologie) Domänen, gekennzeichnet, die die Interaktionen mit anderen Proteinen vermittelt.¹³ Man kann somit die Bcl-2 Familienmitglieder in zwei Kategorien nach Funktion und Struktur einteilen: antiapoptotische Mitglieder, wie Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1 und A1 (vorwiegend BH1, BH2 und BH4), proapoptotische Moleküle, wie Bax, Bak, Bcl-Xs, Krk, Mtd, Bok, Bid, Bad und Bim (vorwiegend nur BH3). Die antiapoptotischen Mitglieder, wie Bcl-2 und Bcl-XL sitzen auf der äußeren Mitochondrienmembran, während die proapoptotischen Familienmitglieder entweder im Zytosol oder auf der Mitochondrienmembran präsentiert sind, man kann sie aber auch ebenso woanders finden, z.B. im Endoplasmatischen Reticulum oder in der Zellhülle.³ In weiteren Untersuchungen wurde dann deutlich, daß die Proteine zum Teil in der Lage sind, untereinander Homo- und Heterodimere zu bilden und dadurch ihre pro- oder antiapoptotischen Wirkungen zu verstärken oder zu vermindern. Daraus kann man folgern, daß nicht nur die Expression der einzelnen Mitglieder der Bcl-2 Familie, sondern auch das Verhältnis der Einzelfaktoren zueinander und ihre Fähigkeit miteinander zuagieren, den Ablauf der Apoptose bestimmen. Einige proapoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie, z.B. Bcl-2, Bcl-XL oder Bax, können direkt die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien bewirken, durch die Fähigkeit Proteinkanäle in der äußeren Membran zubilden, was den Austritt von Cytochrom C ermöglicht. Demgegenüber verhindern die antiapoptotischen Mitglieder durch Bindung an die Mitochondrien die Expression von Cytochrom C.² Bcl-2 kann aber nicht nur die Caspase abhängige Apoptose hemmen, sondern auch die oxidative und hypoxische Nekrose.¹⁴ Es gibt Mechanismen, die eine strukturelle Veränderung der Gene bewirken, z.B. die Translokation von t(14;18), mit Aktivierung von Bcl-2, man findet dies in den meisten Non-Hodgkin Lymphomen. Ein Ungleichgewicht zwischen der Menge von antiapoptotischen und proapoptotischen Familienmitgliedern kann zur Verschiebung in Richtung Überleben der Zelle führen, was die gesteigerte Resistenz von Tumorzellen gegenüber unterschiedlichster Stimuli für den Zelltod, wie z.B. Chemotherapeutika, Medikamente, Bestrahlung, Hypoxie, Tumorsuppressoren und Onkogene, erklärt. So führt eine Überexpression von Bcl-2 zur Resistenz von Krebszellen gegenüber vielerlei Zytostatika, dabei stört es weder das Eindringen noch die Akkumulation der Medikamente in den Tumorzellen, auch bei der initialen Zerstörung der Zellen durch die Zytostatika, noch bei der Rate der Reparaturen spielt es irgendeine Rolle, statt dessen verhindert es nur die Chemotherapeutika induzierte Schädigung durch effiziente Übertragung in den Zelltod.³ In solchen Tumorzellen, die eine hohe Menge an Bcl-2 enthalten, ist es trotzdem möglich den Zellzyklus durch die Medikamente zu inhibieren, so kommt es z.B. zu verzögerten DNS-Synthese oder zur Störung der mikrotubulären Formation wäh-

rend der Mitose. Zusammenfassend lässt sich sagen, daß Bcl-2 die zytotoxische Wirkung der Chemotherapeutika in eine zytostatische Wirkung umkehrt.¹² Ein weiteres Bindeglied zwischen den Proteinen der Bcl-2 Familie und den Effekten der Chemotherapie wurde in Bax gefunden. Die Expression von Bax kann durch die erfolgreiche Gabe von Chemotherapeutika oder durch Bestrahlung in Tumorzellen induziert werden. Die Induktion der Bax Expression wird dem p53 zugeschrieben, welches an typischen Stellen, die im Bax Gen Promoter lokalisiert sind, bindet und damit direkt die proapoptotischen Gene aktiviert.¹² Dies erklärt warum manche Tumoren, wie niedrig maligne NHLs und kleinzellige Lungenkarzinome am Anfang der Therapie mit einer hohen Ansprechrate reagieren.¹² Diese klinischen Antworten reichen jedoch nicht aus, um die gesamten Tumorzellen zu eradizieren, damit sind Rückfälle vorprogrammiert, meistens assoziiert mit dem Verlust des funktionsfähigen p53.¹² Wie oben schon erwähnt induzieren die proapoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie die mitochondriale Membranpermeabilisation. Dies konnte speziell für Bax, Bak und Bid gezeigt werden. Die subzelluläre Lokalisation des Apoptose induzierenden Proteins Bad wird reguliert durch Kinasen und Phosphatasen. Nur unphosphoryliertes Bad ist in der Lage mit Bcl-2- oder Bcl-XL zu interagieren oder diese zu antagonisieren. Es bindet die antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie und triggert die Membranpermeabilisation.¹³ Zusammenfassend lässt sich sagen, daß nach Induktion der Apoptose eine Hochregulation von Bax stattfindet, während die Resistenz von Tumorzellen gegen Zytostatika in vivo und in vitro mit einer verstärkten Expression von Bcl-2 und Bcl-XL assoziiert ist.

2.1.5. Die Rolle der Caspasenfamilie beim programmierten Zelltod

Was sind Caspasen? Zur Zeit sind zehn Mitglieder der Caspasenfamilie (Cystein Proteasen) in menschlichen Zellen beschrieben worden. Diese Proteine werden zunächst als Einzelpolypeptide, sogenannte Zymogene, synthetisiert, die dann eine proteolytische Spaltung an ihren Asparsäureresten durchlaufen und so zum aktiven Enzym werden. Die Caspasen werden durch zwei Spaltungsereignisse zu voll funktionierenden Proteasen aktiviert. Die erste proteolytische Spaltung trennt die Kette in eine kleine und eine große Untereinheit, eine zweite Spaltung entfernt die Prodomäne am N-terminalen Ende.³ Die aktiven Caspasen setzen sich aus Heterotetrameren zusammen, die zwei große (~ 20 kD) und zwei kleine (~ 10 kD) Untereinheiten enthalten, die zwei aktive Seiten des Moleküls formen.^{12,15} Diese Heterodimerenbildung wird ermöglicht durch die Interaktion der Domänen der Proenzyme.¹⁶ Die Caspasen

repräsentieren eine einheitliche Familie von intrazellulären Cysteinproteasen bzw. Cysteinaspartasen die ihre spezifischen Substrate an den Asparatsäureresten in Position P-1 spalten.³ Dies legt nahe, daß die Vorläufer der Caspasen entweder durch Autoaktivierung zur aktiven Caspase werden, oder daß sie durch andere Proteasen innerhalb einer Kaskade gespalten und aktiviert werden. Proteasen können ihre eigene Aktivierung regulieren, sie können eine Schwelle festsetzen, die die Konzentration der aktiven Proteasen in den Zellen kontrolliert, solche festgelegten Grenzen verhindern die Wirkung der spontanen Aktivierungen, ein unerwünschtes Ereignis, da dies den Tod der Zelle zur Folge hat.¹² Caspasen können auch durch andere Proteasen aktiviert werden, z.B. durch das Granenzym B, welches bei aktivierten T- und NK-Zellen aus zytotoxischen Granula freigesetzt wird, so lässt sich die zytotoxische Wirkung zumindest teilweise über die Spaltung von Caspase 3 und 7 erklären.¹² Einige Caspasen enthalten Prodomänen, die als Proteine funktionieren und somit eine Interaktion der Caspasen untereinander als auch eine Interaktion mit anderen Arten von Proteinen erlauben, was wiederum zur Aktivierung oder Inhibierung der Zymogene führen kann.³ Sie sind somit beteiligt an proteolytischen Spaltungen und Aktivierungen von Vorläuferformen verschiedenster Interleukine und an der durch Mitglieder der TNF Rezeptorfamilie (TNFR-1, CD120a und Fas) induzierten Apoptose.³ Die Caspasen werden in drei Gruppen unterteilt, die Exekutoren (auch Effektorcaspasen, oder „Stromaufwärts-caspasen“ genannt), die Apoptoseinitiatoren und die Zytokinprozessoren. Zu den Exekutoren gehören die drei Caspasen 3, 6 und 7, sie koordinieren den programmierten Zelltod.³ Sie enthalten kurze Prodomänen. Die Apoptoseinitiatoren beinhalten die Caspasen 2, 8, 9 und 10 (auch „Stromabwärts-caspasen“ genannt), sie enthalten große Prodomänen, die es ihnen erlauben mit anderen Proteinen zu interagieren, welche die Umformung von den Zymogenen in aktive Proteasen triggern. Die Procaspasen 8 und 10 beinhalten Todeseffektordomänen (DED) an ihrer N-terminalen Prodomäne, während die Caspasen 2 und 9 Caspasenrekrutierungsdomänen enthalten (CARD). Auch die Caspasen 1, 4 und 5 enthalten die Caspasenrekrutierungsdomäne. Die Domänen haben ähnliche Strukturen, zusammengesetzt aus sechs zusammengepackten, amphipatischen, antiparallelen alpha Helices, eine Struktur die ebenfalls in den Todesdomänen von Fas und dem p75 NGF Rezeptoren zu finden ist.² Die DEDs ermöglichen die Bindung an FADD oder an andere Adaptorproteine, die verantwortlich sind für ihre Rekrutierung durch die Todesrezeptoren TNF Familien. Durch die CARDS kommt es zur Bindung an die RAIDD, ein Adaptorprotein, welches mit dem TNRF-1 Komplex interagiert, und Caspase 9, welche das CED-4 Homologen Apaf-1 bindet, und dadurch die Cytochrom C Freisetzung und die Caspasenaktivierung miteinander verbindet.³ Die Exekutoren, wie z.B. Caspase 3 sind in der Lage, eine Reihe von

Enzymen zu aktivieren, die den apoptotischen Zelltod ausführen, können aber auch direkt wichtige zelluläre Strukturen zerstören.³ Caspase 3 kann darüber hinaus antiapoptotische Moleküle wie Bcl-2 und Bcl-XL inhibieren und dadurch den Apoptoseprozess verstärken. Wie kommt es nun zum Tod der Zellen durch die Caspasen? Apoptotische Ereignisse (auch als Degradierungsphase bezeichnet) beinhalten mehrere Prozesse, wie DNS Fragmentation, Chromatinkondensation, Ausstülpungen der Zelle (Zeiose) und nachfolgende Abschnürung der Ausstülpungen (Blebbing), Membranruptur, Zellschrumpfung, Zerstörung von Vesikeln in der Membran.² Eine Aufgabe der Caspasen ist die Inaktivierung von Proteinen, welche die Zellen vor der Apoptose bewahren. Des weiteren werden Fragmente produziert, die den Vorgang des programmierten Zelltodes fördern. Wie oben erwähnt, können Caspasen direkt die Apoptose durch Zerstörung von Zellstrukturen induzieren, oder durch Störung der Organisation verschiedener Proteine, die an der Regulation des Zytoskelettes beteiligt sind. Es kommt zur Unterbrechung von Kontakten zu den anderen Zellen in der Nachbarschaft, zur Minderung der DNS Replikation und Reparatur, zur Zerstörung der DNS, zur Unterbrechung der nukleären Struktur, beispielsweise durch Proteolyse von Laminen oder durch Schädigung des Zytoskelettes durch die Spaltung von Keratin oder Actin, zur Induzierung der Freisetzung von spezifischen Signalen der Zellen oder zur Phagozytose.¹⁶

2.1.6. Die Caspaseninhibitoren

Inhibitoren spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von proteolytischen Systemen, deshalb ist es nicht verwunderlich, das sie auch bei der Kontrolle des Zelltodes involviert sind.² Die Inhibitoren der Apoptoseproteine wurden zuerst in dem Baculovirus entdeckt.² Drei Klassen dieser viralen Inhibitoren sind bekannt, die Familie der IAPs (XIAP, c-IAP1 und c-IAP2), CrmA und p53. IAPs sind die einzigen Inhibitoren, die auch in Säugetierzellen gefunden werden konnten, z.B. die selektiven Inhibitoren für die Caspasen 3 und 7, die sogenannten x-Ketten IAPs, die auch in der Lage sind die Aktivierung der beiden Initiatorcaspasen 8 und 9 zu unterdrücken.^{3,12} Dies lässt vermuten, daß durch die Hemmung der Effektorcaspasen die Apoptose gehemmt wird. Ganz so einfach ist es aber nicht, weil sie daneben auch die Aktivierung dieser Enzyme durch Überexpression verhindern. Die Hemmung der Caspasen durch die IAPs wird vermittelt durch Domänen des Baculovirus IAP, die in den menschlichen IAPs repräsentiert sind. Die Domänen werden für die Bindung an die Caspasen benötigt und sind notwendig für die suffiziente Funktion der IAPs. Zusammenfassend lässt sich sagen,

daß IAPs Brüche im apoptotischen Ablauf durch Bindung, Inhibierung und Verringerung der Caspasen verursachen.² In manchen Tumorzellen sind sie überexprimiert.¹²

3. Zytostatika

3.1. Purin- und Pyrimidinanaloga

Nukleosidanaloga ahmen physiologische Nukleoside bezüglich der Aufnahme und des Metabolismus nach, des weiteren werden sie in neu synthetisierter DNS eingebaut, was zur Synthesehemmung und zum Kettenabbruch führt.¹ Einige dieser Medikamente inhibieren ebenso bestimmte Schlüsselenzyme bei der RNS Synthese und aktivieren direkt die Caspasenkaskade.¹ All diese Effekte führen letztendlich zum Untergang der Zelle.¹ Physiologische Nukleoside sind hydrophil und können dadurch nicht die Plasmamembran passieren, die zelluläre Aufnahme erfolgt daher über Nukleosid spezifische Membrantransportcarrier (NT).¹ Diese werden in zwei Kategorien eingeteilt: gleichgewichtsabhängige (ENT) oder konzentrationsabhängige (CNT) Carrier.¹ Die in den Zellen enthaltenen Deoxyribonukleotidtriphosphat Pools stammen aus zwei unterschiedlichen Quellen. Zum einen werden sie über den de Novo Weg synthetisiert, der vor allem in sich teilenden Zellen zu finden ist, und zum anderen über den Bergungsweg, als Hauptreserve für Nukleoside in ruhenden Zellen.¹ Der Schlüsselschritt im de Novo Weg ist die Konversion von Ribonukleosiddiphosphaten in Deoxyribonukleosiddiphosphaten durch die Ribonukleotidreduktase; vor allem sich teilende hämatopoetische Zellen sind von diesem Mechanismus abhängig, im Gegensatz dazu werden in ruhenden Zellen über den Bergungsweg Basen und Nukleoside für den DNS und RNS Katabolismus recycelt.¹ Diese Verbindungen werden zu erst von der Deoxycytidinkinase (dCK), Thymidinkinase 1 und 2 oder von der Deoxyguanosinkinase (dGK) phosphoryliert.¹ Die aktiven Metabolite werden durch die 5'-Nukleotidase dephosphoryliert.¹

3.1.1. Cladribin (2-Chloro-2'-deoxy- β -D-adenosin, 2-CdA)

3.1.1.1. Wirkmechanismus

Cladribin (2-Chloro-2'-deoxy- β -D-adenosin/2-CdA) gehört zur Gruppe der Nukleosidanaloge. Das Medikament hat sowohl eine zytotoxische Aktivität gegenüber ruhenden als auch gegenüber proliferierenden Lymphozyten. 2-CdA ist ein Adenosinaminase (ADA)-resistentes Purinanalogon¹⁷ durch Protonierung an der Position N-7,^{17,18} so daß die Deaminierung durch dieses Enzym ausbleibt, eine direkte Hemmung des Enzyms durch Cladribin spielt dabei keine Rolle.^{19,21} In Zellen, in welchen ein hohes Verhältnis an intrazellulären Deoxycytidinkinasekonzentrationen zu den 5'-Nukleotidasekonzentrationen vorliegt, kann Cladribin akkumulieren und den Zelltod auslösen.^{19,21,22} Es ist zytotoxisch gegenüber sich teilenden und ruhenden Lymphozyten im peripheren Blut, ebenso gegenüber Knochenmarkszellen von Leukämiepatienten.^{5,19} Nachdem 2-CdA, ein Prodrug, die Membran der Zellen durch ein effizientes Transportsystem passiert hat, wird 2-CdA durch die Deoxycytidinkinase zunächst zum 2-CdA-Monophosphat (2-CdAMP) und anschließend zum 2-CdA-Diphosphat (2-CdADP) phosphoryliert und aktiviert.¹⁸ Die Deoxyadenosinkonzentration wird durch das Enzym ADA reguliert, welches durch Deaminierung zum Deoxyinosine wird.²¹ Anschließend kommt es zur erneuten Phosphorylierung in das aktive Triphosphatdeoxynukleotid (2-CdATP), welches für den zytotoxischen Effekt verantwortlich ist.¹⁸ Das phosphorylierte Derivat 2-CdATP des 2-CdA hemmt die Ribonukleotidreduktase und entleert so den intrazellulären Pool der Deoxynukleotide.^{5,18,19,23} Durch den Einbau von 2-CdATP in die DNS durch die DNS-Polymerase kommt es zur Verzögerung der Kettenverlängerung.^{5,19} Die zytotoxische Wirkung von 2-CdA auf ruhende Zellen ist auf einen Induktionsmechanismus für den programmierten Zelltod (Apoptose) zurückzuführen.²⁴ Der genau Vorgang ist noch unbekannt, eine mögliche Ursache könnte die Akkumulierung abnormaler Konzentrationen von Deoxyribonukleotiden sein.²¹ Durch Behinderung der DNS-Reparatur kommt es zu einer Zunahme der DNS-Strangbrüche und damit zu einer verminderten Synthese von RNS,^{18,19} ursächlich dafür ist eine Verminderung des intrazellulären Enzymkofaktors Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD^+) durch disproportionalen Verbrauch, die damit verbundene Erschöpfung der ATP-Energiequelle führt zum Zelltod.^{21,22} Diese Zytotoxizität könnte partiell aufgehoben werden, wenn die Zellen entweder gleichzeitig mit 2-CdA und dem NAD^+ -Vorläufer Nikotinamid oder aber mit 3-Aminobenzamid inkubiert werden.⁵⁸ Das Nikotinamid führt zur Stabilisierung der NAD^+ -Pools, und das 3-Aminobenzamid führt zur Hemmung der

Poly- (ADP-Ribose)- Synthetase.⁵⁸ Daneben beeinflusst 2-CdA auch die mitochondriale Funktion, genau genommen das proapoptotische Protein Cytochrom c, mit Initiierung der proteolytischen Caspasenkaskade.¹ Des weiteren kann Cladribin durch Kooperation mit Cytochrom c und Apaf-1 zur Aktivierung der Caspase 3 beitragen und triggert damit die Caspase induzierte Apoptose.¹ Die induzierte Apoptose läuft über p53 abhängige oder unabhängige Wege, die p53 Aktivierung reguliert die Spiegel der Expression der p53 abhängigen Proteine, wie Bcl-2 und Bax, die wiederum zur Aktivierung des Caspase Weges führen.¹ Es wird vermutet, daß die PARP Aktivierung in den p53 unabhängigen Mechanismus des durch 2-Cda verursachten Zelltodes involviert ist.¹

In vitro Studien haben auch gezeigt, daß die Substanz durch die mitochondriale Polymerase in die DNS eingebaut wird und so zu einer Störung der mitochondrialen Transkription führt.¹ Die Behandlung mit Cladribin führt zur prolongierten Abnahme der CD4⁺-Zellen und der CD8⁺- Zellen. Dabei erfolgt die Erholung der CD8⁺-Zellen schneller als die der CD4⁺-Zellen. Sie kann mehrere Monate bis zu einem Jahr dauern und länger.⁵⁸ 2-CdA ist auch in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu passieren und kann dort Konzentrationen erreichen, die durchschnittlich 25% der Plasmakonzentration betragen.⁵⁸ 2-CdA wird wahrscheinlich durch das renale Kationensystem ausgeschieden.⁵⁸

3.1.1.2. Unerwünschte Wirkungen

Die häufigsten unerwünschten Wirkungen von 2-CdA, die schon während der ersten zwei Wochen auftreten, sind Knochenmarkssuppression, Fieberreaktionen, Müdigkeit, Infektionen, Exantheme, Übelkeit und Kopfschmerzen.⁵⁹ Daneben kommt es zu Störungen des Magen-Darm-Traktes, des Nervensystems, des Herz-Kreislaufsystems, der Atemwege und des Bewegungsapparates (Muskel -und Gelenkschmerzen).⁵⁹ Zu Neutropenien, Fieber (meistens bedingt durch Pilzinfektionen), Anämien und Thrombozytämien kommt es meist innerhalb des ersten Monats.²¹ Die Knochenmarkssuppressionen bilden sich meist innerhalb der ersten zwei Monate wieder zurück.²¹ In einigen Fällen wurde auch über längeranhaltende Panzytopenien und aplastische Anämien berichtet.²¹ Wie oben schon erwähnt kommt es durch die Therapie mit Cladribin zur Reduktion der CD4⁺-und CD8⁺ Lymphozyten, so daß mit einer erhöhten Inzidenz an opportunistischen Infektionen zu rechnen ist.²¹ So wurden in Einzelfällen Herpes Infektionen (Herpes zoster, Herpesretinitis) und Pneumocystis-carinii-Pneumonien beobachtet.⁵⁹ Neurologische Untersuchungen zeigten Hinweise für Demyelinisierungen der Nerven

mit dem Auftreten von Neuropathien.⁵⁹ Bei erhöhten Dosierungen wurde auch über akutes Nierenversagen berichtet.⁵⁹ Eine große Tumormasse kann durch die Therapie mit Cladribin ein Tumorlyse-Syndrom zur Folge haben. Wie oben schon erwähnt induziert Cladribin DNS-Strangbrüche in Säugerzellen, daneben führt es auch zu Chromosomenmutationen, so daß eine gewisse Kanzerogenität nicht ausgeschlossen werden kann.²¹ Die empfohlene Dosis beträgt 0,1 mg/kg/Tag bzw. 3,6 mg/m²/Tag als kontinuierliche Infusion über sieben Tage.²¹ Einsatz findet Cladribin bei Patienten mit Haarzelleukämien, mit niedrigmalignen NHLs, mit Makroglobulinämie Waldenström¹⁸ sowie mit B-CLLs^{19,25} und mit kutanen T-Zell-Lymphomen, welche resistent sind gegenüber anderen Therapien.^{17,21-23} Eine Effektivität lässt sich auch bei akuten myeloischen Leukämien, Langerhanszell Histiozytosen, MS und anderen Autoimmunerkrankungen, wie z.B. die idiopathische autoimmune hämolytische Anämie erzielen.²⁰ Limitierender Faktor der Therapie ist die Thrombozytopenie und die Neuropathien.²³

3.1.2. Gemcitabin (2',2'-difluorodeoxycytidin, dFdC)

3.1.2.1. Wirkmechanismus

Gemcitabin ist eine Pyrimidinanalogon welches Cytosinarabinosid enthält,²⁶ es ist ein Anti-metabolit der Deoxycytidine, an Position 2' des Deoxyribosezuckers wurden die zwei Hydrogenatome gegen Fluorinatome ausgetauscht.^{5,27} Gemcitabin wirkt sowohl in menschlichen als auch in murinen Zellen zytotoxisch, dabei inhibiert es zum einen die DNS Replikation und die DNS Reparatur, zum anderen hemmt es die DNS Synthese und führt zur Steigerung der Apoptoserate.²⁶ Dieser Effekt ist abhängig von der intrazellulären Akkumulation der dFdC Nukleotide.^{28,29} Es wirkt zellphasenspezifisch, dabei werden die Zellen vor allem während der DNS-Synthese (S-Phase) abgetötet, daneben kann es unter gewissen Voraussetzungen zur Blockierung der Zellprogression am Übergang von der G1-Phase zur S-Phase kommen.⁶⁰ Die zytotoxische Wirkung ist abhängig von der Konzentration und der Zeit. Das Pyrimidinanalogon Gemcitabin wird intrazellulär durch die Deoxycytidinkinase zunächst zum Monophosphat und dann zu dem wirksam Diphosphatnukleosid (dFdCDP) phosphoryliert und anschließend zu dem aktiven Triphosphatnukleosid (dFdCTP) metabolisiert.^{5,29} Das wichtigste Nukleotidderivat des Gemcitabin ist das dFdCTP, die Konzentration des Triphosphates steht in einem konstanten Verhältnis zu den Mono- und Diphosphaten.²⁹ Die intrazelluläre Kon-

zentration und Akkumulation der aktiven Metabolite ist größer als bei anderen Pyrimidinanaloge, verursacht durch die größer Membranpermeabilität und Affinität der Deoxycytidinkinase für Gemcitabin.²⁶ Außerdem bleibt es permanent in der vorletzten Position der DNS Wachstums-kette positioniert.⁵ DFdC ist z.B. bei verschiedenen leukämischen Zelllinien hundertmal zytotoxischer als Ara-C.²⁷ Die zytotoxische Wirkung von Gemcitabin scheint auf zwei Wirkungen von dFdCDP und dFdCTP zu beruhen. DFdCDP blockiert die Ribonukleotidreduktase^{27,29} wahrscheinlich irreversibel²⁸, die allein die Reaktion katalysiert, welche die für die DNS-Synthese benötigten Deoxynukleosidtriphosphate liefert. Durch diese Blockade des Enzyms kommt es zu einer allgemeinen Reduktion der Konzentration von Deoxynukleotiden und speziell von dCTP.²⁹ Dieser Abfall führt zur Selbstpotenzierung des dFdC Metabolismus und zum Auslösen verschiedener Mechanismen.²⁹ Daraus resultiert zum einen eine höhere Aktivität der Enzyme, wodurch dFdC schneller phosphoryliert wird, zum anderen konkurriert dFdCTP mit dCTP um die DNS Polymerase und um die Inkorporation in die DNS.^{28,29} Durch die intrazelluläre Abnahme des dCTP wird der Einbau des Gemcitabin Metaboliten dFdCTP in die DNS verstärkt und die Rate der dFdC Monophosphat Deamination verringert, was bei der Verlängerung der Retentionszeit von dFdCTP eine Rolle spielt.²⁹ Zusätzlich kommt es zur Störung der DNS-Polymerase Epsilon, die nicht in der Lage ist Gemzar aus der DNS zu entfernen und die wachsenden DNS-Stränge zu reparieren.²⁸ Nachdem Einbau des dFdCTP in die DNS, erfolgt der Einbau eines weiteren Nukleotids. Die weitere DNS-Synthese wird vollständig inhibiert (maskierte Ketten-Beendigung). Der aktive Diphosphat-Metabolit inhibiert indirekt ebenfalls die DNS Synthese durch Hemmung der Ribonukleotidreduktase.¹ Durch den Einbau des Pyrimidinanalogons bzw. dessen Triphosphats wird der programmierte Zelltod, sprich die Apoptose eingeleitet. Die Inaktivierung von Gemcitabin erfolgt über die Deaminierung in den inaktiven Metaboliten dFd-U durch die Cytidin-Deaminase (CDD) oder durch Dephosphorylierung des dFdMP durch die 5'-NU.¹ Es wurde gezeigt, daß Gemcitabin über signifikante Aktivitäten bei einer Vielzahl von Tumoren verfügt, dazu gehören Tumoren des Pankreas, des Ovars sowie das nicht kleinzellige und kleinzellige Bronchialkarzinom.^{5,26} Daneben zeigt es auch in vitro Aktivitäten bei Zellen hämatologischer Tumoren.²⁶ Der Abbau des Gemcitabin erfolgt durch die Cytidin-Deaminase in der Leber, in den Nieren, im Blut und in anderen Organen.⁶⁰

3.1.2.2. Unerwünschte Wirkungen

Die meisten Nebenwirkungen sind von der verabreichten Dosis des Medikamentes abhängig, so auch die hämatologische Toxizität.⁶⁰ Es kann zur Knochenmarkssuppression kommen mit Anämie, Leukozytopenie und Thrombozytopenie, wobei die neutrophilen Granulozyten am stärksten betroffen sind.⁶⁰ Seltener werden Thrombozytosen beobachtet. Bei einer Kombinationstherapie oder Sequenztherapie kann es zur kumulativen Myelosuppression kommen.⁶⁰ Auch der Gastrointestinaltrakt als Gewebe mit hoher Proliferationsrate kann durch die Behandlung geschädigt werden (Übelkeit, Diarrhoen, Erbrechen, Obstipation und Stomatitiden, Erhöhungen der GPT und anderer Leberwerte). In einigen Fällen wurden Nierenfunktionsstörungen und vereinzelt hämolytisch-urämische Syndrome gesehen.⁶⁰ Schwerwiegende, zum Teil tödliche Lungentoxizitäten, z.B. Lungenödem, interstitielle Pneumonitis oder akutes Atemnotsyndrom beim Erwachsenen (ARDS) sind sehr selten.⁶⁰ Atemnot kann insbesondere beim kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) ein Zeichen für eine interstitielle Pneumonie bzw. für ein beginnendes ARDS sein.⁶⁰ Bei gleichzeitiger Strahlentherapie des Tumors besteht die Gefahr schwerwiegender, möglicherweise lebensbedrohlicher Nebenwirkungen, schwere Ösophagitiden und Pneumonitiden, deshalb sollte auf die Kombination dieser beiden Behandlungen verzichtet werden.⁶⁰ Die Dosierung beim Pankreaskarzinom und beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom beträgt 1000 mg/m² i.v. und wird über 30 Minuten einmal wöchentlich gegeben.⁶⁰ Bei auftreten obenstehender Nebenwirkungen kann die Dosis von Gemzar angepasst werden.

3.1.3. Cytarabin (1-β-D-arabinofuranosylecytosine, Ara-C)

3.1.3.1. Wirkmechanismus

Das Zytostatikum Cytarabin gehört zu der Gruppe der Antimetabolite, ein strukturelles Analogon der Deoxycytidine.¹ Der Unterschied besteht darin, daß an Position 2 des Zuckers der β-Konfiguration eine Hydroxylgruppe zu finden ist.¹ Das Eindringen in die Zelle ist abhängig von der Plasmakonzentration des Medikamentes.¹ Nach dem Eintritt in die Zelle, wird Ara-C zunächst durch die dCK Pyrimidinkinase zum aktiven 5'-Triphosphat Derivat Ara-CTP phosphoryliert.¹ Der Katabolismus von Ara-C resultiert aus der schnellen Deamination durch

die Cytidin-Deaminase (CDD) zu seinem nichttoxischen Metaboliten Arabinosiduridine, während Ara-CMP durch die zytoplasmatische 5'-Nucleotidase (5'-NU) abgebaut wird.¹ Die neoplastische Wirkung des Medikamentes folgt aus der protrahierten Hemmung der DNS-Synthese, vor allem während der S-Phase⁶¹ und ist Dosis abhängig. Es kommt zum einen zur kompetitiven Hemmung der DNS-Polymerase und zum anderen zur Inkorporation von Ara-CTP in die DNS, Folge ist der Kettenabbruch, resultierend in einer Lücke der DNS Synthese.^{1,30} Entscheidend für die antineoplastische Wirkung sind anhaltend hohe intrazelluläre Ara-CTP-Konzentrationen.¹ Für Cytarabin sind zahlreiche Resistenzmechanismen bekannt, dazu gehört zum einen die Hemmung des Membrantransportes, der Mangel an phosphorylierenden Enzymen, die erhöhte Aktivität inaktivierender Enzyme, die verminderte Affinität der DNS-Polymerase und zum anderen der erhöhte dCTP-Pool. Ara-C wird bisher eingesetzt zur Remissionseinleitung, zur Konsolidierung und zur Erhaltungstherapie akuter lymphatischer und nichtlymphatischer Leukämien bei Erwachsenen und Kindern.⁶¹ Des weiteren zur Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen vom intermediären und hohem Malignitätsgrad. Auch bei der Hochdosistherapie der refraktären Non-Hodgkin-Lymphome, nichtlymphatischen und lymphoblastischen Leukämien, rezidivierender akuter Leukämien und Leukämien mit besonderem Risiko findet Ara-C Anwendung.⁶¹

3.1.3.2. Unerwünschte Wirkungen

Die Nebenwirkungen der Ara-C-Therapie sind abhängig von der Dosis, der Anwendungsart und der Therapiedauer. Cytarabin besitzt erbgutschädigende und teratogene Eigenschaften.⁶¹ Wie bei den meisten Chemotherapeutika kommt es unter Ara-C zur Knochenmarksdepression.⁶¹ An Blutbildveränderungen wurden Leukopenien, Thrombozytopenien und Anämien beobachtet; die Leukopenien treten in der Regel 12 bis 24 Tagen nach Therapiebeginn auf.⁶¹ Neben dem Knochenmark wird auch der Gastrointestinaltrakt geschädigt, die Schädigung führt zu Übelkeit und Erbrechen, zu gravierenden Veränderungen der Schleimhäute des Magen-Darm-Traktes mit Ulzerationen, Darmwandemphysem und Infektionen, mit der Gefahr von Darmnekrosen und nekrotisierenden Kolitiden, daneben kommt es zum Anstieg der Cholestase-anzeigenden Enzyme, zum Auftreten von Leberventhrombosen (Budd-Chiari-Syndrom) und Pankreatitiden.⁶¹ Nach Applikation konventioneller Dosen wurden gelegentlich toxisch bedingte Hautreaktionen in Form von makulopapulösen Exanthenen oder Erythrodermien gesehen.⁶¹ Hochdosiert können sich generalisierte Erytheme mitunter mit Bla-

senbildung und Desquamation entwickeln, sowie brennende Schmerzen an den Handinnenflächen und Fußsohlen.⁶¹ Eine Toxizität des Medikamentes besteht auch für das Nervensystem. Vor allem bei der Hochdosistherapie wurden zentralnervöse Störungen beobachtet: zerebrale und zerebellare Störungen (Nystagmus, Dysarthrie, Ataxie), Kopfschmerzen, Denkstörungen, Somnolenz, Lethargie, Koma und Krampfanfälle.⁶¹ Die prädisponierenden Faktoren sind dabei die Nieren- und Leberfunktion, sowie ein hohes Lebensalter, vorausgegangene ZNS Behandlungen (Bestrahlung, intrathekale Zytostatikaapplikationen) und vermehrter Alkoholabusus.⁶¹ Berichtet wurde auch über Herzmuskelschäden (Herzrhythmusstörungen, akute Perikarditis), über Myalgien und Arthralgien, sowie über Augenbeschwerden in Form von Konjunktivitis, Keratitis und Photophobie.⁶¹ Als Cytarabin-Syndrom bezeichnet man einen Symptomenkomplex bestehend aus Fieber, Myalgien, Knochenschmerzen, gelegentlich Brustschmerzen, makulopapulösen Ausschlag, Konjunktivitis und Unwohlsein. Prophylaktisch werden Kortikosteroide gegeben.¹⁸

3.1.4. Fludarabin (9-β-D-arabinosyl-2-fluoroadenine, F-ara-A)

3.1.4.1. Wirkmechanismus

Fludarabin gehört zur Gruppe der antineoplastischen Wirkstoffe. Es ist ein Analogon des Adenosin (Ado) und ist resistent gegenüber der Deamination durch die Adenosin-Deaminase (ADA).¹ Es wirkt wie Cladribin auf sich teilende und nicht teilende Zellen. Die Phosphatgruppe an Position 5 der Arabinose hat die alleinige Funktion die klinische angewandte Form des Chemotherapeutikums wasserlöslich zu machen.¹ Vor Eintritt in die Zelle wird zunächst Fludarabin durch das membranständige CD37 zu F-ara-A dephosphoryliert, welches dann aktiv in die Zelle aufgenommen und dort intrazellulär durch die Deoxycytidinkinase über das Mono- und Diphosphat zum aktiven Triphosphat F-ara-ATP phosphoryliert wird.^{1,5,10} Dieser Metabolit ist der Einzige, der zytotoxische Aktivität aufweist und dazu in der Lage ist, die DNS-Synthese durch die Hemmung der Ribonukleotidreduktase,¹⁰ der DNS-Polymerase α/β und ε, Topoisomerase II und der DNS Ligase zu verhindern.¹ Die Hemmung der DNS-Synthese wird vermittelt durch die Konkurrenz der Triphosphatmetaboliten mit den Deoxyadenosintriphosphaten (dATP) um den Einbau in die DNS durch die DNS-Polymerase.¹ Ebenso erfolgt eine partielle Hemmung der RNS-Polymerase II, woraus eine Reduzierung der Pro-

teinsynthese resultiert, was den Strangabbruch zur Folge hat, während die Hemmung der Ribonukleotidreduktase eine Reduktion der dNTP Pools bewirkt.¹ Die oben erwähnten Wirkungen auf die DNS, RNS und Proteinsynthese führen zur Störung des Zellwachstums, es kommt zur Induktion der Apoptose.¹ Der Einfluss auf die DNS Synthese spielt bei den nicht teilenden Zellen die größte Rolle.¹ Nach genauer Betrachtung scheint es, als würde sowohl 2-CdA als auch Fludarabin die PARP Aktivierung induzieren, was in einem Verbrauch von NAD⁺ resultiert und damit zu einer Erschöpfung der Adeninnukleotide führt und damit zum Zelltod.¹ Des weiteren ist erwähnenswert, daß F-ara-ATP Apaf-1 aktivieren kann mit der daraus resultierenden Aktivierung des Caspase 9 und 3 Weges, es ist ebenfalls fähig die Bcl-2 Expression herunterzuregulieren.¹ Es besteht eine lineare Beziehung zwischen der extrazellulären Exposition mit 2F-Ara-A und der intrazellulären Anreicherung des aktiven Metaboliten 2F-Ara-ATP. Das wasserlösliche 2F-Ara-AMP wird im menschlichen Organismus zum Nukleosid Fludarabin (2F-Ara-A) dephosphoryliert. Die Elimination von 2F-Ara-A erfolgt im Wesentlichen über die Nieren.⁶² Fludarabin findet Anwendung bei Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie vom B-Zell-Typ und ausreichender Knochenmarksreserve, und bei Patienten, die auf eine Behandlung mit einem oder mehreren alkylierenden Substanzen (Standard Therapieschemata) nicht angesprochen haben.⁶²

3.1.4.2. Unerwünschte Wirkungen

Zu den häufigsten Nebenwirkungen gehört die Störung und Schädigung des blutbildenden Systems und des lymphatischen Systems.⁶² Es kommt zu Neutropenien, Thrombozytopenien und Anämien, die auftretende Myelosuppression kann schwerwiegend und kumulativ sein.⁶² Durch Reduktion der Anzahl der T-Lymphozyten ist das Risiko des Auftretens von opportunistischen Infektionen und die latente virale Reaktivierung erhöht (z.B. progressive multifokale Leukenzephalopathie).⁶² Da die therapeutische Wirkung von Fludarabin relativ schnell einsetzt, besteht bei Patienten mit großer Tumorzellmasse die Gefahr eines Tumor-Zerfall-Syndroms, diese Komplikation kann mit verschiedenen Symptomen einhergehen, wie Hypeurikämie, Hyperphosphatämie, Hypokalzämie, metabolische Azidose, Hyperkalämie, Hämaturie, Ausscheidung von Harnsäurekristallen und Nierenversagen.⁶² Gelegentlich wurden periphere Neuropathien, Verwirrungen, optische Neuritis, optische Neuropathien, Blindheit und in ganz seltenen Fällen Koma und Erregung gesehen.⁶² Häufig sind auch Störungen des Gastrointestinaltraktes wie Übelkeit, Erbrechen, Diarrhö, Stomatitis und Appetitlosigkeit.⁶²

Daneben kommt es eher selten zur Schädigung des Respirationstraktes (Pneumonien, Fibrose), Überempfindlichkeitsreaktionen, wie Lungeninfiltrate, Pneumonitis, Fibrose, die mit Husten und Dyspnoe einhergehen.⁶² In Einzelfällen wurde über das Auftreten eines Stevens-Johnson-Syndroms oder einer toxisch-epidermalen Nekrolyse (Lyell-Syndrom) berichtet, sowie Herzversagen oder Herzrhythmusstörungen.⁶² Zu hohe Dosen von Fludarabin können zur irreversiblen Schädigung des ZNS führen, die sich in verzögert auftretender Blindheit, Koma und Tod äußern kann.⁶²

3.1.5. Bendamustin

3.1.5.1. Wirkmechanismus

Bendamustin gehört zu den antineoplastisch wirksamen Medikamenten, es ist eine alkylierende Substanz und gehört zur Gruppe der Stickstoff-Lost Derivate der bifunktionellen Alkylanzien, die zu langanhaltenden DNS-Strangbrüchen und zur Induktion der Apoptose führen.⁵⁷ In Position 5 ist die Stickstofflost-Gruppe an einen Benzimidazolring mit einer Methylgruppe in Position 1 und einem Butansäurerest in Position 2 gebunden, des weiteren besitzt es einen Purinring, aufgrund dieser molekularen Strukturen verbindet Bendamustin die Eigenschaften der alkylierenden Substanzen mit denen der Purinanaloga und der Aminosäureanaloga.^{57,31} Die zytotoxische Wirkung von Bendamustin basiert auf der Fähigkeit die DNS-Einzelstränge und Doppelstränge durch Alkylierung zu vernetzen, dadurch kommt es zur Störung der Matrizenfunktion der DNS und der RNS-Synthese.⁵⁷ Daneben entstehen Cross-Links zwischen der DNS und den Proteinen untereinander.³² Im Gegensatz zu den anderen alkylierenden Substanzen, induziert Bendamustin länger anhaltende Doppelstrangbrüche, was zu unterschiedlichen Interaktionen mit der DNS führt, dies erklärt wahrscheinlich die Lücke der kreuzresistenten mit den anderen alkylierenden Medikamenten, wie z.B. Cyclophosphamid oder Chlorambucil.⁵⁷ Diskutiert wird eine eigene antimetabolische Wirkung des Benzimidazolringes. Nach Applikation wird es schnell und quantitativ zu seinen Mono- und Dihydroxyderivaten hydrolysiert.³² Es gibt sowohl polare als auch apolare Metabolite des Bendamustins, so besitzt das β -Hydroxyderivat β -OH-Bendamustin als Hauptmetabolit im Plasma ähnliche Wirkung und zytotoxische Aktivität.⁵⁷ Bendamustin beeinflusst nicht nur sich teilende Zellen, sondern wirkt auch auf nicht teilende Zellen, die in der G0 Phase verharren, wie sie in den meisten

Fällen der niedrigmalignen Lymphome zu finden sind, der Effekt entsteht wahrscheinlich durch die Induktion der Apoptose, vermutet wird eine Erhöhung der Bax Expression oder eine Verminderung der Bcl-2 Expression.⁵⁷ Bendamustin findet therapeutische Anwendung als Einzelsubstanz oder in Kombination mit anderen antineoplastischen Medikamenten bei der Behandlung verschiedener maligner Erkrankungen, wie Morbus Hodgkin (Stadien II-IV), niedrigmaligne Non-Hodgkin-Lymphome, Plasmazytome, chronisch lymphatische Leukämien und Mammakarzinome, Wirkungen wurden auch gezeigt bei kleinzelligen Bronchialkarzinomen und anderer solider Tumoren.⁵⁷

3.1.5.2. Unerwünschte Wirkungen

Wie bei den meisten antineoplastisch wirksamen Chemotherapeutika kommt es bei der Therapie mit Bendamustin zur reversiblen Einschränkung der Knochenmarksfunktion mit Leukopenien (Lympho -und Granulozytopenie) und Thrombozytopenien.⁵⁷ Limitierende Faktoren der Therapie mit Bendamustin sind Neurotoxizitäten, wie Lethargie, Polyneuropathien oder Verwirrtheit, kardiale Arrhythmien und Dysfunktionen der Speicheldrüsen, wie Mundtrockenheit.⁵⁷ Neben der Abnahme der Lymphozytenzahl kommt es durch das Medikament zu einem Abfall der CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten und damit zu einer Verminderung des CD4/CD8-Verhältnisses, es gibt keine Studien die eine erhöhtes Risiko für nosokomiale Infektionen belegen können.⁵⁷ Begleitend kann es zu einem Abfall des Hämoglobins mit gelegentlichen Anämien kommen.⁶³ In Einzelfällen wurden hämolytische Anämien beobachtet. Im Bereich des Magen-Darm-Traktes kommt es zu Übelkeit und Erbrechen (Grad 1-3),⁵⁷ Appetitlosigkeit, Obstipation und Diarrhö und vereinzelt zu ulzerativen-hämorrhagischen Ösophagitiden.⁶³ An der Haut kann es durch die Wirkung der Substanz zu Erythemen, Hautausschlägen und Hautveränderungen, Gesichtsrötung und Schleimhautreizung wie Stomatitis kommen.⁶³ Bei der intravenösen Bolusgabe wurden lokale Reizerscheinungen und Thrombophlebitiden gesehen.⁵⁷ Ausnahmen sind die Entstehung eines Stevens-Johnson-Syndroms oder einer toxisch epidermalen Nekrolyse (Lyell-Syndrom).⁶³ Eine Überdosierung des antineoplastisch wirkenden Medikamentes kann die irreversible toxische Wirkung auf das ZNS zur Folge haben, die sich in verzögert auftretender Blindheit, Koma und sogar Tod äußern kann. Ein Antidot ist nicht bekannt.⁶³

4. Material und Methoden

4.1. Materialien

4.1.1. Reagenzien

Acrylamid	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat Kristallin	Sigma, Deisenhofen
Aqua Dest	Braun, Melsungen
7-Aminoactinomycin	Sigma, Deisenhofen
BCIP	Promega, Mannheim
Benzonase	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue R 250	AppliChem, Darmstadt
Essigsäure 100 %	Merck, Darmstadt
FCS	Greiner, Frickenhausen
Ficoll	Biochrom, Berlin
Glycerol	ICN Biochemicals Inc., Aurora, USA
Glycin	Roth GmbH + Co, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
HPLC-Reagenz	Merck, Darmstadt
HPLC-Probengläser	Merck, Darmstadt
JC-1	Alexis Biochemicals,
L-Glutamin	Life Technology, Paisly, Scotland
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Biochrom, Berlin
Methanol	Riedel-de Haen, Seelze
Milchpulver, Carnation	Nestle, USA
Multi Mark (Marker)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
NaCl	Merck, Darmstadt
NBT	Promega, Mannheim
PBS	Life Technology, Paisly, Scotland
Penicillin, Streptomycin	Bio Whittaker, Vernal, Belgien

Phosphorsäure	Riedel-de Haen, Seelze
RPMI 1640	Life Technology, Paisley, Scotland
TENMED	Roth GmbH + Co, Karlsruhe
SDS	AppliChem, Darmstadt
See Blue (Marker)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Tetrabutylammoniumhydroxid	Merck, Darmstadt
Tris	USB, Bad Homburg
Türklösung	Merck, Darmstadt
Tween 20	Serva, Heidelberg

4.1.2. Radiochemikalien

[³ H] 2-Cda	Spezif. Aktivität: 444 GBq/mmol	Amersham, Little Chalfont,
	Totale Aktivität: 37 MBq	England

4.1.3. Zytostatika

Bendamustin-Hydrochlorid	Ribosefarm, München
Cladribin (2-Cda)	Janssen-Cilag GmbH, Neuss
Cytarabin (Ara-C)	Upjohn GmbH, Heppenheim
Fludarabin (F-Ara)	Medac Schering AG, Berlin
Gemcitabin (dFdC)	Lilly, Bad Homburg

4.1.4. Zelllinien

HEL (myeloisch)	DKFZ, Heidelberg
HL 60 (myeloisch)	DKFZ, Heidelberg
HUT 78 (lymphatisch)	DKFZ, Heidelberg
JURKAT (lymphatisch)	DKFZ, Heidelberg

4.1.5. Arbeitsmaterialien

Ammoniumheparinat-Monovetten	Sarstedt, Nürmbrecht
Analysenwaage	Mettler, Gießen
Autosampler L-7200 + Dosierschlaufe	Merck, Darmstadt
Blottinggerät	Biorad, München
Brutschrank	Heraeus, Hanau
ELISA-Reader	Tecan, Grödig, Salzburg, Österreich
Eppendorfreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
FACScan flow cytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon-Tubes	Sarstedt, Nürmbrecht
Feinwaage	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Gelgießstand	Biorad, München
Gelkämme	Biorad, München
Geltrocknungsrahmen	Promega, Mannheim
Glasplatten	Biorad, München
Gradientensystem	Merck, Darmstadt
Klammerpaare für Gelpräparat.	Biorad, München
Kühlzentrifuge	Heraeus, Hanau
Kulturflaschen	Nunc, Heidelberg
Kulturflaschen	Becton Dickinson, Heidelberg
Lamin-Air-Arbeitsbank	Heraeus, Hanau
Magnetrührer	IKA, Staufen
Mehrkanalpipette	Flow, Meckenheim
Merck-Hitachi HPLC system	Merck, Darmstadt
Mini Protean 3 Elektrophoresesystem	Biorad, München
Mikroskop	Leitz, Wetzlar
Mikrotiterplatten	Nunc, Heidelberg
Mischgerät (wippend)	Heidolph, Schwabach
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Schreck, Hofheim
Nitrocellulosemembran	Biorad, München
ODS Hypersil 5 µm Säule	Shandon, Frankfurt/Main

pH-Meter	Schott, Hofheim
Photometer (Ultrospec)	Pharmacia Biosystems, Freiburg
Pipetten	Falcon, Heidelberg
Pumpe L-6200	Merck, Darmstadt
Radioaktivitätsmonitor LB 506 C-1	Berthold, Bad Wildbad
Reaktionsgefäße	PE Biosystems (Roche), Mannheim
Sample loading guide	Biorad, München
Spannungsgeber (power supply)	Biorad, München
Tischzentrifuge	Tomy Kogy Co, Fukushima, Japan
Varifuge K	Heraeus, Hanau
Vortexer	IKA, Staufen
Whatman 3 MM Filterpapier	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen

4.1.6. Software

Lysis II software package	Becton Dickinson, Heidelberg
Magellan software	Tecan, Grödig/Salzburg, Österreich
Software calculusn	Biosoft, Camebridge, UK
Win Flow	Berthold, Bad Wildbad

4.1.7. Proliferationsassay

XTT	Roche Diagnostics, Mannheim
MTT	Roche Diagnostics, Mannheim

4.1.8. Rezepte für den Western Blot

<u>Ammoniumpersulfat (APS)</u>	1 g	Kristallin-Pulver
	10 ml	Aqua dest.
<u>AP – Puffer</u>	1 ml	NaCl 5 M
	0,25 ml	MgCl ₂ 1 M
	5 ml	Tris HCl pH 9,5 1 M

	43,75 ml	Aqua dest.
<u>Bromphenolblau</u>	0,1 %	Bromphenolblau in 100 ml Aqua dest.
<u>Coomassie Blue</u>	0,25 g 45 ml 45 ml 10 ml	Coomassie Brilliant R 250 Methanol Aqua dest. Essigsäure 100 %
<u>Destain</u>	600 ml 300 ml 100 ml	Aqua dest. Methanol Essigsäure 100 %
<u>Elektrophoresepuffer</u>	30,20 g 188 g 900 ml 50 ml auf 1 l	Tris Glycin Aqua dest. SDS 10 % ad Aqua dest.
<u>Lysispuffer</u>	1,5 ml 3 ml 3 ml 19,5 ml	Tris HCl pH 6,8 1 M SDS 20 % Glycerol 100 % Aqua dest.
<u>NaCl 5 M</u>	292,20 g 1 l	NaCl Aqua dest.
<u>Running Puffer 10 x</u>	30,26 g 187,70 g 10 % auf 1 l	Tris Glycin SDS Aqua dest.
<u>Running Puffer 1 x</u>	25 mM 250 mM	Tris Glycin
<u>SDS 10 %</u>	10 g	SDS auf 100 ml auffüllen
<u>SDS 20 %</u>	20 g	SDS auf 100 ml auffüllen
<u>TBS 10 x</u>	50 ml 300 ml 650 ml	Tris HCl pH 8 2 M NaCl 5 M Aqua dest.
<u>TBST 1 x</u>	100 ml 500 µl auf 1 l	TBS 10 x Tween 20 Aqua dest.
<u>Transferpuffer</u>	115,2 g 24,0 g 6,4 l	Glycin Tris Aqua dest.

	1,6 l	Methanol
<u>Tris-Puffer 1,5 M pH 8,8</u>	1,5 M	Tris Pulver in H ₂ O lösen mit HCl auf pH 8,8 einstellen
<u>Tris-Puffer 1,0 M pH 6,8</u>	1,0 M	Tris Pulver in H ₂ O lösen mit HCl auf pH 6,8 einstellen

4.1.9. Primär-Antikörper

Bad	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Bak	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Bax	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Bcl-X _S /L	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Bid	BD Biosciences
Caspase 3	Transduction Laboratories
Caspase 7	Becton Dickinson, Heidelberg
Caspase 8	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Caspase 9	Transduction Laboratories
clAP-1	R&D Systems, Wiesbaden
clAP-2	R&D Systems, Wiesbaden
xlAP	R&D Systems, Wiesbaden
p 53	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
PAR 4	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
PARP	Boehringer, Mannheim

4.1.10. Sekundär-Antikörper

Anti-Rabbit IgG (Fc)	Promega, Mannheim
Anti-Mouse IgG (Fc)	Promega, Mannheim

4.2. Inkubationsschemata

4.2.1. Inkubationsschemata der Zytostatika bei der HPLC-Messung

Jeweils im Doppelansatz:

2-CdA:		Gemcitabine:	
Konzentration	zugegebene Menge	Konzentration	zugegebene Menge
0,05 µg/ml	2,1 µl	1 µg/ml	0,5 µl
0,1 µg/ml	4,2 µl	2 µg/ml	1,0 µl
		4 µg/ml	2,0 µl

Die Kontrolle enthielt nur die beiden Konzentrationen von 2-CdA. Kombiniert wurden jeweils die beiden Konzentrationen des Cladribin mit den drei Kombinationen von Gemcitabin. Die Inkubationszeiten betrugen 1h, 3 h, 5 h und 8 h. Unterschieden wurde dabei zwischen einer sequentiellen und einer simultanen Applikation der beiden Chemotherapeutika. Gleichzeitig bedeutete in diesem Fall, dass beide Substanzen zur gleichen Zeit (Stunde 0) auf die Zellen gegeben wurden. Die Zellen wurden dann für die oben genannten Zeiten im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Bei der sequentiellen Inkubation wurden die Zellen zunächst für 3 h mit Gemcitabin beimpft, anschließend dreimal gewaschen und erneut für 21 h in Medikamenten freiem Medium inkubiert. Nach Beendigung erfolgte die Zugabe von Cladribin.

4.2.2. Inkubationsschemata der Zytostatika bei der Apoptosemessung und der Messung des Zusammenbruchs des mitochondrialen Membranpotentials

Die Inkubationszeiten betrugen 24 h, 48 h und 72 h. Auch hier wurde zwischen einer konsekutiven und gleichzeitigen Inkubation der Zellen mit den Zytostatika unterschieden. Analysiert wurde, ob durch die verschiedenen Inkubationsschemata und durch die unterschiedlichen Medikamentenkombinationen additive oder synergistische Effekte zu erreichen waren, oder ob es zu antagonistischen Wirkungen kam. Ein Antagonismus lag dann vor, wenn der gemessene Wert über dem Erwarteten lag, umgekehrt handelte es sich um einen synergistischen Effekt. Der erwartete Wert war derjenige, der sich durch Addition der Einzelwerte der Kom-

binationspartner ergab. Der Gemessene war der durch die Kombination der Medikamenten-paare erzielte. Zur Beurteilung der antagonistischen und synergistischen Effekte eignet sich die Combinations-Index Methode.^{33,34}

4.2.3. Combinations-Index Methode^{33,34}

Bei der Combinations-Index Methode werden Dosiswirkungskurven miteinander verglichen.

Für die Dosiswirkung wurde eine generelle Gleichung definiert:

$$f_a / f_u = (D / D_m)^m$$

wobei D die Medikamentendosis, D_m die Dosis für den medianen Dosisseffekt, f_a die Fraktion der Zellen, bei denen eine Wirkung erzielt wurde (affected), f_u die Fraktion der Zellen, bei denen keine Wirkung erzielt wurde (unaffected) ($f_u = 1 - f_a$), bezeichnete. Der Exponent m kennzeichnete die Form der Dosis/Effekt-Kurve und wurde mit dem Verlauf der Median Effect Plots berechnet. Dieser wurde auf der x-Achse als $\log(D)$ und auf der y-Achse als $\log(f_a / f_u)$ aufgetragen:

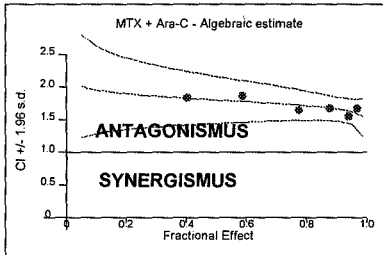
$$\log(f_a / f_u) = m \log(D) - m \log(D_m)$$

Diese Gleichung ergab eine Gerade, $y = mx + b$. Der Combinations-Index (CI) für Zytostatika, die unterschiedliche Wirkungen haben, wurde wie folgt definiert:

$$CI = (D)_1 / (D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2 + (D)_1 (D)_2 / (D_x)_1 (D_x)_2$$

$(D)_1$ war das Zytostatikum 1, $(D)_2$ war das Zytostatikum 2 und x die Rate der Apoptose in %. Diese Analysen wurden mit der Calcsyn software (Biosoft, Camebridge, UK) durchgeführt.

Combination index (CI) vs Isobologram

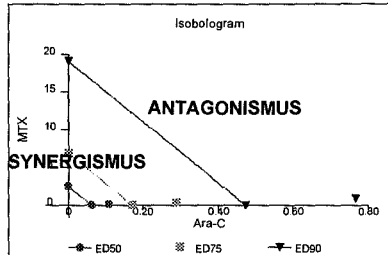


mutually exclusive drugs (ähnlicher Wirkmechanismus)

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2}$$

mutually non-exclusive drugs (unterschiedliche Mechanismen)

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2} + \frac{(D)_1(D)_2}{(D_x)_1(D_x)_2}$$



CI=Additiver Effekt

CI<1=Synergismus

CI>1=Antagonismus

$(D)_1, (D)_2$ = x-Effekt in Kombination
 $(D_x)_1, (D_x)_2$ = x-Effekt alleine

Jeweils im Doppelsatz

1. Versuche:

4.2.3.1. 2-CdA: Stammlösung 1 mg/ml

Konzentration	Verdünnung	zugegebene Menge
0,01 µg/ml	1:100	1 µl
0,05 µg/ml	1:100	5 µl
0,2 µg/ml	1:100	20 µl
0,6 µg/ml	1:10	6 µl
2,0 µg/ml	1:10	20 µl

4.2.3.2. Ara-C: Stammlösung 100 mg/ml

Konzentration	Verdünnung	zugegebene Menge
0,25 µg/ml	1:1000	2,5 µl
1,25 µg/ml	1:100	1,25 µl
5,0 µg/ml	1:100	5 µl
15 µg/ml	1:100	15 µl
50 µg/ml	1:100	50 µl

4.2.3.3. Fludarabin: Stammlösung 1 mg/ml

Konzentration	Verdünnung	zugegebene Menge
0,6 µg/ml	1:10	6 µl
3,0 µg/ml	1:10	30 µl
12 µg/ml	unverdünnt	12 µl
36 µg/ml	unverdünnt	36 µl
120 µg/ml	unverdünnt	120 µl

4.2.3.4. Bendamustin: Stammlösung 1 mg/ml

Konzentration	Verdünnung	zugegebene Menge
2,5 µg/ml	2:1	1,25 µl
12,5 µg/ml	2:1	7,25 µl
50 µg/ml	2:1	25 µl
150 µg/ml	4:1	37,5 µl
500 µg/ml	4:1	125 µl

2. Versuche:

4.2.3.5. Ara-C: Stammlösung 100 mg/ml

Konzentration	Verdünnung	zugegebene Menge
0,25 µg/ml	1:1000	2,5 µl
1,25 µg/ml	1:100	1,25 µl
1,75 µg/ml	1:100	1,75 µl
2,5 µg/ml	1:100	2,5 µl
5 µg/ml	1:100	5 µl

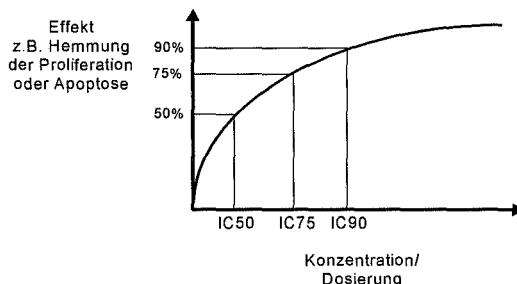
Kombinationen, jeweils im Doppelansatz:

Ara-C:	200	+ die obengenannten Einzelkonzentrationen von:
	100	Bendamustin
	20	Fludarabin
	10	2-Cda
	2	
	1	
	0,2	
	0,1	
	0,02	
	0,01	

4.2.5. Dosierungen für die Analyse der apoptoserelevanten Proteine

Für die Analyse der Expression der apoptoserelevanten Proteine wurden die Konzentrationen der IC 50 gewählt. Die IC 50 gibt die Inhibiting concentration an, die von einer Substanz benötigt wird, um einen Effekt von 50 % zu erreichen. Dabei werden die Begriffe IC, ED (effect dose) oder EC (effect concentration) synonym verwendet. Die hier gewählten Medikamentenkonzentrationen waren diejenigen, die bei der Messung der Apoptoseinduktion eine Apoptoserate von 50 % erzielten. Die IC 50 wurde ausgesucht, um die erzielten Ergebnisse reproduzieren zu können. So wurden genau definierte Versuchsbedingungen geschaffen, die es erlaubten die erzielten Ergebnisse miteinander zu vergleichen. Daneben war davon auszugehen, daß noch ausreichend vitale Zellen in den Proben vorhanden waren.

IC50, ED50, EC50



4.3. Methoden

4.3.1. Zellseparation nach Ficoll-Hypaque

Die Zellen wurden aus heparinisiertem Blut von Normalpersonen und Patienten (n=4) mit CLL (n=4) isoliert. Dazu wurde das Blut unter einer Sterilitätsbank mit PBS 1:2 verdünnt und 20 ml dieser Verdünnung wurden auf 15 ml eines diskontinuierlichen Ficoll-Gradienten der Dichte 1,077 überschichtet. Nach Zentrifugation für 20 min bei 1000 U/pm mit ausgeschalteter Bremse und Raumtemperatur reicherten sich die Zellen an der oberen Grenzschicht des Ficoll-Gradienten an, während Erythrocyten und Granulocyten durch den Gradienten sedimentierten, und das thrombozytenhaltige Plasma den Überstand bildete. Die Zellen wurden vorsichtig mit einer 10 ml Pipette abgesaugt und 2 x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen noch einmal im Medium gewaschen und dann der weiteren Methodik zugeführt.

4.3.2. Zellzahlbestimmung

Zu 180 µl Türklösung wurden 20 µl der zu untersuchenden Zellsuspension gegeben und gemischt. Eine Neubauerkammer wurde mit der Mischung beschickt, und nach dem Sedimentieren wurden die außen liegenden 16er Quadrate ausgezählt. Die Zelldichte wurde dann nach der folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl/Quadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Kammervolumen}} = \text{Zellen}/\mu\text{l}$$

Um die Genauigkeit zu erhöhen wurden vier Quadrate ausgezählt und das arithmetische Mittel gebildet. Anschließend konnten die Zellen auf die gewünschte Konzentration eingestellt werden.

4.3.3. Kultur von Zelllinien

Die Zelllinien HL60, HEL, JURKAT und HUT 78 wurden in RPMI 1640 - Medium bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert, dabei wurde das Kulturmedium 3 x / Woche erneuert.

4.3.4. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Bei der Hochflüssigkeitschromatographie handelt es sich um eine Variation der klassischen Säulenchromatographie. Der bei der klassischen Form stattfindende Separationsprozess führt zur Auftrennung einzelner Komponenten eines Gemisches durch Interaktion einer mobilen Phase mit einer stationären Phase, dabei werden die einzelnen Inhaltsstoffe unterschiedlich stark gebunden, was ein getrenntes Auffangen der einzelnen Bestandteile ermöglicht, wenn sie am Ende der Säule austreten. Problem der klassischen Methode ist, daß die Trennleistung bedingt durch die Inhomogenität in den Matrices sehr eingeschränkt wird. Bei der Hochflüssigkeitschromatographie hat man das Problem der verminderten Trennleistung durch den Einsatz eines verbesserten Füllmaterials auf der Basis von Kieselgelen gelöst. Diese winzigen Kügelchen mit einem Durchmesser von 3-10 µm führen zu einem homogenen Säulenbett mit entsprechend guter Auflösung. Bei diesem Verfahren kommt es aber zu vernachlässigbaren kleinen Flussraten, da das chromatographische Bett mit seinen dichtgepackten Partikel einen hohen Strömungswiderstand bietet, somit sind hohe Drücke vonnöten, um die mobile Phase mit vernünftiger Geschwindigkeit durch das Säulenbett zupressen. Die benötigten hohen Drücke werden bei der HPLC mit speziellen Pumpen unterschiedlichster Funktionssysteme erzeugt. Da die herkömmlichen Säulen der Säulenchromatographie diesen hohen Drücken nicht standhalten, werden bei der HPLC die Füllmaterialien, sprich die stationäre Phase, in Stahlzylinder gepackt. So entstehen in der HPLC hohe Flussraten, wodurch die gelösten Substanzen die Gleichgewichtseinstellung mit den winzigen Perlen so schnell erreichen, daß gelöste Substanzen mit unterschiedlichster Affinität für die Matrix selbst bei hohen Flussraten sehr wirksam voneinander getrennt werden können.

Im Folgenden werden die einzelnen Komponenten der HPLC-Anlage erläutert mit kurzer Erwähnung des Troubleshootings.

4.3.4.1. Die Pumpe

Bei der hier benutzten „solvent metering“ Pumpe handelte es sich um eine Tauchkolbenpumpe, bei der üblicherweise Mehrkopfpumpen verwendet werden, da dieser Pumpentyp etwaige Pulsationen erheblich reduziert. Dabei werden zwei Kolben wechselweise gefüllt und entleert, so daß stets ein Kolben sich im Zustand des Entleerens (Förderschlag) befindet und den Fluss aufrechterhält. Da die Pumpe ein typisch mechanisches Teil ist, unterliegt es stark der Abnutzung und des Verschleißes, was zu Störungen der gesamten HPLC-Anlage führen kann, deshalb sollte man mit der Pumpe immer sehr sorgfältig umgehen und bestimmte Anforderungen beachten. Wichtige Pumpenteile, die dem Verschleiß unterliegen oder störanfällig sind, sind die Tauchkolben, die Dichtungen, die Einlassfilter und die Absperrventile. Symptome für Störungen an den eben genannten Pumpenteilen äußern sich im Anstieg der Retentionszeit, als unregelmäßige Basislinie, als Druckabfall, als Druckpulsationen, im Fehlen konstanter Flussgeschwindigkeiten, in schlechter Ansaugung der mobilen Phase und als Luftblasen in den Leitungen nach der Pumpe. Ursachen, die zu Schäden an der Pumpe und damit zu Störungen der Pumpfunktion führen sind vielfältig, dazu gehören Versagen der Absperrventile, Schäden an Dichtungen und Kolben, Verunreinigungen der mobilen Phase mit Partikeln unterschiedlichster Genese oder Luftblasen. Bei Verunreinigungen ist ein Filtern der mobilen Phase dringend erforderlich. Gründe für die Entstehung von Luftblasen sind verstopfte Filter oder Lecks in der Ansaugleitung, zu niedriger Flüssigkeitspegel in der Vorratsflasche der mobilen Phase, flüchtige Lösungsmittel (z.B. Methanol), HPLC Gradientenanlagen mit Mischung vor der Pumpe (Niederdruck) oder schlechtes Entgasen der mobilen Phase. Die Entgasung der mobilen Phase wird am besten nach der Vermischung der verschiedenen Komponenten durchgeführt. Entgast werden kann mit Hilfe eines Ultraschallbades oder Durchspülen mit kleinen Heliumblasen. Letzteres eignet sich besonders beim Einsatz von Gradientensystemen.

4.3.4.2. Die Gradientensysteme

Bei komplexen Probengemischen, wie sie hier verwendet wurden, kann es wünschenswert sein, die Zusammensetzung der mobilen Phase zu verändern, während die Substanzen durch die Säule wandern. Dabei erfolgt die Änderung in die Richtung, in welcher die Elutionskraft der mobilen Phase zunimmt, so werden Peaks, welche sonst erst spät oder überhaupt nicht

eluiert würden, beschleunigt. Bei der hier benutzten Niederdruckmischung werden die zwei Flüssigkeiten 5mM Tetrabutylammoniumphosphat mit 15 % igem Methanol und 100 % igem Methanol auf der Einlassseite der Pumpe vermischt. Die Mischung wird von der Pumpe gefördert, dabei werden Magnetventile in der Ansaugleitung von einem in der Pumpe befindlichen Mikroprozessor angesteuert. Durch Öffnen und Schließen dieser Ventile kann die Zusammensetzung der mobilen Phase mit den eluierenden Lösungsmitteln festgelegt werden, sie wurde hier von 100:0 (v/v) in 30 Minuten linear auf 30:70 (v/v) verändert. Auch die Gradientenanlage unterliegt gewissen Störanfälligkeiten, die durch frische, entgaste und gefilterte Lösungsmittel, luftdichtes Anschließen der Ansaugleitungen, Lösungsmittelvorratsflaschen auf höherem Niveau über der Pumpe und ausreichender Menge an mobiler Phase, vermieden werden können.

4.3.4.3. Die Probenaufgabensysteme

Die Probenaufgabe ist ein kritischer Punkt in der HPLC. Das Probengemisch sollte ohne Luft in der Mitte des Säulenansangs platziert werden. Dies ermöglichen Dosierschlaufen-Injektions-Autosampler (z.B. die L-7200 von Merck) mit Hochdruckinjektionsventilen, bei denen unter Atmosphärendruck aus einer kleinen Flasche die Proben in eine Probenschleife überführt werden. Der Inhalt der Probenschleife wird durch Drehen des Injektionsventils in den Hochdruckfluss von der Pumpe zur Säule eingebracht. Das Injektionsvolumen betrug 80µl.

4.3.4.4. Die Säule

Die hier verwendete Säule war eine auf Silica basierende Reversed-Phasen-Säule, eine 5µm ODS Hypersil analytische Kolumne 250 x 3 mm I.D. Silicagel ist ein Adsorbens bestehend aus Siliziumatomen, welche durch Sauerstoffatome dreidimensional verbrückt sind. Das Netzwerk ist endständig durch OH-Gruppen abgesättigt. Die Siliane tragen am Silizium-Atom C18- Kohlenstoffketten, dadurch ist bei der Reversed-Phase-Chromatographie die stationäre Phase weniger polar als die mobile Phase. Bei Reversed-Phasen-Chromatographien werden normalerweise wässrige Pufferlösungen mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln wie Methanol, als mobile Phasen verwendet. Unpolare Bestandteile aus der Probe oder der mobilen Pha-

se werden stark adsorbiert. Deshalb ist bei der Trennung von stark ionisierbaren Verbindungen eine genaue pH-Wert Einstellung vonnöten. Die mobile Phase mit Tetrabutylammoniumphosphat und 15 % igem Methanol wurde mit Phosphorsäure auf einen pH-Wert von genau 3,9 titriert, da die Reproduzierbarkeit der Retentionszeit stark abhängig ist von der Reproduzierbarkeit des pH-Wertes. Ein basischer pH-Wert kann die stationäre Phase schädigen, da sich Silicagel bei einem hohen pH-Wert noch schneller in Wasser löst. Weitere Probleme bei der Reproduzierbarkeit ergeben sich, wenn vorher nicht ausreichend konditioniert wird, d.h. die Säule muss vor Gebrauch mit Methanol und der mobilen Phase bis zum Erreichen des Gleichgewichtes ausreichend gespült werden. Nach Gebrauch wird die Säule erneut mit Methanol und mit der mobilen Phase gespült. Die Säule bedarf generell einer guten Behandlung, mechanische Erschütterungen oder Fallenlassen können zu Rissen in den Füllmaterialien führen, was eine Abnahme der Leistungsfähigkeit der Säule und damit verbreitete Peaks oder sogar Doppelpeaks zur Folge hat. Auch das Austrocknen sollte vermieden werden, obwohl Säulen auf der Basis von Silica bei nicht vollständiger Austrocknung regeneriert werden können. Da jedoch die trockenen Partikel unter diesen Bedingungen enger zusammengedrückt sind, muss man bei der Handhabung besonders vorsichtig sein. Man sollte deshalb auch mit niedrigeren Flussraten beginnen und diese allmählich auf die gewünschte Flussrate erhöhen. Feste oder schlecht lösliche Partikel der mobilen Phase oder des Probengemisches können zu Verstopfungen der Säule führen. Die Verstopfungen führen zu einem Druckanstieg, zu einer reduzierten Flussrate oder zu Peakveränderungen. Da die meisten Verunreinigungen aus dem Probengemisch stammen ist es wichtig die Proben vor dem Gebrauch an der HPLC-Anlage ausreichend von festen Partikeln, sprich Zellresten nach der Extraktion zu befreien. Zu diesem Zweck wurden die Proben zunächst für 10 Minuten bei maximaler Umdrehung in einer Tischzentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und in ein neues Eppendorfcup überführt, dieser wurde erneut für 30 Minuten bei selber Umdrehungszahl und Temperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut vorsichtig abpipettiert und in ein neues Eppendorfcup gefüllt. Die Proben waren so frei von Partikeln, welche die Säule verstopfen könnten.

4.3.4.5. Die mobile Phase

Die mobile Phase soll in Wechselwirkung mit der gewählten stationären Phase das Probengemisch möglichst optimal und rasch trennen, dabei sind bestimmte Faktoren zu berücksich-

tigen, um Störungen, wie Beschädigungen oder Verstopfungen der Geräte, Veränderungen des chromatographischen Verhaltens, zu geringe Empfindlichkeit des Detektors, Rauschen oder Driften der Basislinie oder zusätzliche Peaks bei der Gradientenelution zu vermeiden. Entscheidende Faktoren sind die Viskosität und die Reinheit des Lösungsmittels. Ein Lösungsmittel geringerer Viskosität ergibt bei einem gegebenen Volumenstrom einen kleineren Druck als ein höher visköses, und der Stoffaustausch erfolgt rascher. Vor allem bei der Verwendung von Reversed-Phasen-Säulen (Phasenumkehr) spielt die Reinheit des Lösungsmittels eine entscheidende Rolle. Zu berücksichtigen ist auch die Reinheit der Lösungsmittelkomponente Wasser, so sollte man grundsätzlich kein Leitungswasser oder entsalztes Wasser verwenden, vor allem dann nicht wenn man mit Gradientensystemen arbeitet, weil dadurch die Elution beeinträchtigt und die Säule geschädigt wird. Geeignet sind deshalb spezielle HPLC-reine Wasser (z. B. HPLC-Reagenz von Merck). Das Lösungsmittelgemisch aus Tetrabutylammonium, Ammoniumhydrogenphosphat und Methanol sollte immer vor Gebrauch frisch angesetzt werden, zum einen weil es sich bei Methanol um eine leicht flüchtige Substanz handelt, was zu einer beträchtlichen Veränderung der Zusammensetzung der mobilen Phase führen kann, und zum anderen kann es bei längerem Stehen zu Verunreinigungen kommen, was seinerseits zu Problemen des chromatographischen Ergebnisses führt. Da wie oben schon erwähnt bei der Reversed-Phasen-Chromatographie die stationäre Phase weniger polar ist als die mobile, ist es wichtig, daß die mobile Phase eine Substanz enthält, die an die C18-Kohlenstoffketten der Siliane binden kann, um die Polarität der stationären Phase zu erhöhen. Daher fand hier das Tetrabutylammoniumphosphat Anwendung, es bindet mit seinem Butyl-Ende an die Kohlenstoffketten und ragt mit dem positiv geladenen Ammoniumende in das Säuleninnere hinein und bewirkt somit die Phasenumkehr. Das unpolare mit [^3H] markierte 2-CdA wird durch die in den Zellen vorhandene Deoxycytidinkinase zum Mono-, Di- und Triphosphat phosphoryliert. Das gebundene Phosphat bewirkt eine negative Polarität der Metabolite des 2-CdA. Beim Durchfluss durch die Reversed-Phase-Säule können die negativ geladenen phosphorylierten Metabolite des 2-CdA an das positiv geladene Ammoniumende des Tetrabutylammoniumphosphates binden. Dabei wird das Monophosphat am schwächsten und das Triphosphat am stärksten gebunden, was zu einer zeitlich differentiellen Elution der Metabolite führt. Das Monophosphat tritt somit als erstes am Ende der Säule aus. Um das Tetrabutylammoniumphosphat allmählich wieder von der stationären Phase zu lösen wird mit Hilfe des Gradientensystems der Anteil des durchfließenden Methanols erhöht, da dieses die Lösung des Tetrabutylammoniumphosphates ermöglicht.

4.3.4.6. Zusammensetzung der mobilen Phase

Die mobile Phase bestand aus vier Komponenten:

- 50 mmol Ammoniumhydrogenphosphat $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
mit einer Konzentration von 115 g/mol, entsprechend einer Menge von 5,75 g
- 87 mmol Tetrabutylammoniumhydroxid $(\text{C}_{16}\text{H}_{36}\text{N}^+)$
mit einer Konzentration von 181 g/mol, entsprechend einer Menge von 15,75 g

Zu den beiden Substanzen wurden 150 ml Methanol geben und mit HPLC-Reagenz auf einen Liter aufgefüllt. Die mobile Phase mit einem basischen pH-Wert von 9,3-9,8 wurde auf einem Magnetrührer durch Titration mit Phosphorsäure auf den pH-Wert von 3,9 eingestellt.

4.3.4.7. Der Detektor

Zur Darstellung der mit $[^3\text{H}]$ markierten Metabolite des 2-CdA fand hier als Detektor der HPLC Radioaktivitätsmonitor und Szintillator LB 506 C-1 Verwendung. Beim $[^3\text{H}]$ (Tritium) handelt es sich um einen Alpha-Strahler, bei welchem aus dem Ausgangskern ein Kern des Elementes Helium, bestehend aus zwei Protonen und zwei Neutronen, abgestrahlt wird. Dieser Heliumkern wird Alphateilchen genannt. Die ausgesandten Alphateilchen erzeugen ein diskretes Energiespektrum, weil beim Zerfall immer nur zwei Partner, das Alphateilchen und der Restkern entstehen. Alphateilchen besitzen nur sehr kurze Reichweiten, in Luft ca. 4-9 cm, in festen Stoffen sogar nur wenige Millimeter oder nur Bruchteile von Millimetern. Der Szintillationszähler nutzt die optische Wirkung der radioaktiven Strahlung aus. Ihre Wirkung beruht darauf, daß Teilchen ausreichend hoher Energie beim Auftreffen auf anorganische und organische Substanzen Leuchterscheinungen, sogenannte Szintillationen hervorrufen. Diese Szintillationen werden von dem Detektor registriert und an den Computer weitergegeben.

4.3.4.8. Die Probenvorbereitung

Doch bevor man zur Nutzung der HPLC-Anlage kommt, müssen die Proben für die Messung vorbereitet werden. Die Zellen der vier Zelllinien wurden wie oben beschrieben zentrifugiert,

gewaschen und auf die Zellzahl von 5×10^6 Zellen pro Milliliter eingestellt. Danach wurden die Zellen mit den Zytostatika nach obenstehendem Pipettierschema beimpft. Die Zellsuspensionen wurden für 1 h, 3 h, 5 h und 8 h bei 36°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellsuspensionen zunächst bei 1000 Upm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Das Zellpellet wurde mit 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert und erneut bei 1500 Upm für 5 min zentrifugiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit eiskaltem PBS erfolgte die Extraktion. Extrahiert wurde mit einem Gemisch aus Methanol und PBS im Mischungsverhältnis 1:1. Davon wurden dann 250 µl auf das Zellpellet gegeben. Nach kurzem vortexen erfolgte eine 24 stündige Inkubation der Proben bei – 20°C. Nach beendeter Extraktion mussten die Proben wie oben erläutert von den Zellresten gereinigt werden, um nicht die Säule oder andere Teile der HPLC-Anlage zu beschädigen. Der genaue Vorgang wurde im Abschnitt „die Säule“ erläutert. Die fertigen Proben standen somit der Messung an der HPLC-Anlage zur Verfügung oder konnten bei – 80°C für eine beliebige Zeit eingefroren werden. In einem Radioaktivitätscounter wurde der Gehalt der Radioaktivität bestimmt, dazu wurden 10 ml der Probe mit 3 ml einer Szintillationsflüssigkeit gemischt (Ultima Gold) und gut geschüttelt. Bevor gemessen wurde, wurde das Ganze für 30-60 Minuten stehen gelassen, da es durch das Schütteln zur Bildung von Lichtblitzen kam, welche die Messung hätten verfälschen können. Für die Auftrennung der einzelnen Komponenten der Probengemische, mussten vor Injektion über die Dosierschleife in die Säulenmitte, 100 µl der Proben in spezielle für die HPLC geeignete Reaktionsgefäße gefüllt werden, darin enthaltene Glaseinsätze erlaubten eine genaue Aufnahme des Gemisches durch die Injektionsnadel des Autosamplers. Die Membran im Deckel wurde so hineingelegt, daß diese beim Durchstechen durch die Injektionsnadel nicht verrutschen konnte, da es sonst zu einer fehlerhaften oder zu einer fehlenden Aufnahme gekommen wäre. Der Messschlitten konnte mit maximal 80 Proben bestückt werden. Der Autosampler ermöglichte eine automatische Reihenummessung aller 80 Proben. Der Separationsprozess konnte beginnen.

4.3.5. Analyse der Apoptoserate mit 7-AAD am FACScan Durchflußzytometer

Die Apoptose und der programmierte Zelltod sind wichtige Prozesse in der Regulation der zellulären Proliferation und der zellulären Differenzierung. Das Erkennen und die Quantifizierung von apoptotischen Zellen wird so zu einem wichtigen Bestandteil zur Klärung der Rolle der Apoptose im Leben einer Zelle. Um die Untersuchung der Apoptose zu ermöglichen, be-

darf es einer Methode, die es erlaubt, einfach, schnell und genau eine große Zahl an Zellen mit übereinstimmenden immunophänotypischen Oberflächenantigenen in einer heterogenen Zellpopulation, z.B. Blut oder Knochenmark, zuerkennen und zu quantifizieren. Das hier benutzte 7-Amino-Actinomycin-D (7-AAD), ein fluoreszierendes an die DNA bindendes Substrat, welches zwischen die Cytosin- und Guaninbasen interkaliert, hat dies ermöglicht. Das 7-AAD wurde als Einzelsubstanz zur Erkennung apoptotischer Zellen mittels der FACS-Methode („fluorescence-aktivated cell sorting“) am Durchflußzytometer eingesetzt.

4.3.5.1. Vorbereitung zum Messen

Das 7-AAD wurde in Aceton gelöst und in PBS auf eine Konzentration von 200 µg/ml verdünnt. Die Lösung wurde lichtgeschützt bei -20°C aufbewahrt. Nachdem die Zellen wie oben beschrieben auf die gewünschte Zellzahl eingestellt wurden, wurden diese mit den Zytostatika beimpft und für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeiten wurden die Röhrchen bei 2500 Upm (300 g) für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, und es folgte ein Waschschritt mit 1 ml PBS pro Röhrchen ebenfalls bei 2500 Upm (300 g) für 5 min. Das Zellpellet wurde mit 100 µl PBS resuspendiert und kurz gevortext. Auf jede Zellsuspension wurden 20 µl 7-AAD gegeben. Der Tropfen wurde dabei nicht direkt in die Zellsuspension pipettiert, sondern an den Rand der FACS-Röhrchen, damit die Inkubationszeiten nicht voneinander differierten. Die Röhrchen wurden kurz geschüttelt, um eine gleichmäßige Verteilung des 7-AAD zu erreichen. Die Inkubationsdauer betrug 20 min. Da es sich bei dem 7-AAD um eine sehr giftige Substanz handelt, sollte grundsätzlich unter dem Abzug gearbeitet werden. Der Abfall musste gesondert entsorgt werden. Die Messung am Durchflußzytometer musste zügig vonstatten gehen, um die 20 minütige Inkubationszeit nicht zu überschreiten. Ein gleichzeitiges inkubieren von mehr als 30 Röhrchen mit 7-AAD ist deshalb nicht zu empfehlen.

4.3.5.2. Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie mit dem FACScan erlaubt die fünfparametrische Charakterisierung von Zellen. Es können gemessen werden: die Zellgröße, die Granularität sowie drei Fluoreszenzwellenlängen. Das Durchflußzytometer besteht aus vier Teilen, der Ansaugvorrichtung,

der Messzelle mit einer Laserlichtquelle, dem optischen System und der Auswerteeinheit, dem PC.

Über die Ansaugvorrichtung zieht das Durchflußzytometer die Zellen, die sich in der Zellsuspension befinden über eine Stahlkapillare an. Das Röhrchen mit der Zellsuspension sollte vorher kurz auf geklopft werden, um eine Verstopfung der Stahlkapillare durch größere Zellkonglomerate zu vermeiden. Es ist darauf zu achten, daß der Abschluss des Röhrchens mit der Stahlkapillare dicht ist, da miteingezogene Luft den Messvorgang stören oder sogar unterbrechen kann. Die eingezogenen Zellen befinden sich zwischen Stahlkapillare und Messzelle in einer Trägerflüssigkeit und in einem Flüssigkeitsstrom, der es ihnen gestattet nur sehr langsam hintereinander herzufließen. So wird jede Zelle einzeln der Messkammer, einer Quarzküvette, zugeführt. Pro Sekunde können mehrere tausend Zellen in die Messkammer gebracht werden. Die Zahl der eingezogenen Zellen kann vorher an der Auswerteeinheit eingegeben werden. Die einzelnen Zellen werden von einem Laserstrahl, von der in der Messkammer befindlichen Laserlichtquelle, beschossen. Bei dem Laser handelt es sich um einen Argonlaser, der Licht der Wellenlänge 488 nm emittiert. Das Licht verläßt die Zelle wieder und wird von Lichtdetektoren aufgefangen, die dabei zwei verschiedene Qualitäten erfassen: die Streuung des Lichtes durch die Zelle und die Emission von Licht unterschiedlicher Farbe, das von Fluoreszenzen, die von dem Laserlicht angeregt wurden, ausgesendet wird. Die Streuung des Lichtes beim Auftreffen auf die Zellen entsteht durch die unterschiedlichen Bestandteile aus denen eine Zelle besteht, den Membranfalten, den intrazellulären Komponenten, wie Granula, Vakuolen und Nukleolus, die das Licht mit unterschiedlicher Qualität und Quantität streuen und in verschiedene Richtungen ablenken.

Auch die Zellgröße, der Querschnittsdurchmesser und der Refraktionsindex spielen eine wichtige Rolle bei der Lichtstreuung. Dabei ist die Lichtstreuung am größten im Kleinwinkelbereich (3° - 10°) des einfallenden Lichtstrahls (Vorwärtsstreulicht, Forward angle light scatter, FSC), zusätzlich streut ein geringer Teil des Lichtes seitwärts (90°) (Seitwärtsstreulicht, Side angle scatter, SSC). Das Vorwärtsstreulicht gibt in erster Linie Aufschluss über die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht über die Granularität und den Grad der Membranfaltung. Ein weiteres Phänomen beim Auftreffen des Lichtes auf die Zelle ist, neben dem Streulicht, die Fluoreszenz: die rasch abklingende Lichtemission von Molekülen nach Absorption energiereicher Strahlung.

Verschiedene fluoreszierende Verbindungen, wie das 7- Amino-Actinomycin, absorbieren Lichtenergie über einen vergleichsweise weiten, für sie charakteristischen Wellenlängenbe-

reich, durch diese Energie werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben und emittieren beim Zurückfallen auf das Grundniveau ein Photon.

Die Durchflußzytometrie macht es nicht nur möglich Zellpopulationen in einer heterogenen Zellsuspension zu erkennen, sondern man kann anhand der FSC/SSC-Diagramme Lymphozyten, Granulocyten und Monocyten aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe und Granularität voneinander unterscheiden. In Kombination mit der fluoreszierenden Substanz 7-AAD ist es wie oben erläutert möglich tote bzw. apoptotische und lebende Zellen zu trennen und zu quantifizieren. Die Darstellung der Fluoreszenzen kann in zwei Arten von Diagrammen erfolgen, dem Histogramm und dem hier bevorzugten Dotplot, in dem zwei Parameter in einem zweidimensionalen Diagramm dargestellt werden. Die Auswertung der einzelnen Dotplots erfolgte mit der Lysis II Software von Becton Dickinson.

4.3.6. Analyse der Apoptoserate mit JC-1 am Durchflußzytometer

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Apoptoserate am Durchflußzytometer ist die Bestimmung des Zusammenbruches des Mitochondrienmembranpotentials. Die dazu benötigte Substanz JC-1 [5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide] ist ein mitochondrialer Farbstoff der in lebenden Zellen Mitochondrien in Abhängigkeit vom Membranpotential anfärbt. Dabei unterscheidet man die JC-1-Aggregate, die bei hohem Membranpotential eine rote Fluoreszenz emittieren, wenn sie an der Mitochondrienmembran von gesunden Zellen binden, von den JC-1-Monomeren, die bei niedrigem Membranpotential eine grüne Fluoreszenz emittieren, wenn sie bei apoptotischen Zellen im zytoplasmatischen Kompartiment der Zelle verbleiben. Ist die Mitochondrienmembran depolarisiert (-100 mV), befindet sich der Emissionspeak der JC-1-Monomere im Wellenlängenbereich von 527 nm. Bei Hyperpolarisation der Mitochondrienmembran (-140 mV) verschiebt sich der Emissionspeak der JC-1-Aggregate in den Wellenlängenbereich von 590 nm. JC-1-Aggregate und JC-1-Monomere befinden sich im Gleichgewicht. Für die Analyse am FACScan Durchflußzytometer wurden die Zellen entsprechend der Analyse mit 7-AAD vorbereitet und auf eine Zellkonzentration von 100.000 – 500.000 Zellen/ml eingestellt. Nach Abschluss der Inkubationszeit mit den Zytostatika wurden die Zellsuspensionen bei 2500 Upm (300 g) für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, und das Zellpellet mit 1 ml PBS resuspendiert und gewaschen. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 2500 Upm (300 g) für 10 Minuten. Nach dekantieren des Überstandes wurde das gewaschene Zellpellet mit 400 µl PBS resuspendiert. Zu jeder Probe wurden nun 4 µl der JC-1-Stammlösung (5 mg ge-

löst in 5 ml Methanol) zugegeben, anschließend wurden diese kurz gevortext, um eine gleichmäßige Verteilung des JC-1 zu erreichen. Pro Minuten wurden jeweils die beiden Doppelansätze einer Probe beimpft, um die Inkubationsdauer von 20 Minuten nicht zu überschreiten. Deshalb sollten nicht mehr als maximal 36 Proben gleichzeitig mit JC-1 inkubiert werden. Nach erfolgter Inkubation konnten die Proben der Zellanalyse am FACScan Durchflußzytometer in den Fluoreszenzkanälen FL1 und FL2 zugeführt werden. Die Auswertung erfolgte mit der Lysis II software von Becton Dickinson.

4.3.7. Analyse der Apoptoserate mit Annexin am Durchflußzytometer

Annexin V ist ein 36 kDa großes nicht-glykosyliertes Phosphoprotein. Unter den Eigenschaften des Annexin V steht seine starke kalziumabhängige Bindung an Phospholipide im Vordergrund, weil es dadurch zur Untersuchung der Vorgänge an der Zellmembran während der Apoptose geeignet ist. Dazu wird es mit Biotin, FITC oder PE gekoppelt und kann anschließend für fluoreszenzmikroskopische oder FACS-Analysen benutzt werden.^{35,36} Die Lipiddoppelmembran gesunder Zellen unterliegt einer strengen Asymmetrie, in der zwei Reihen amphiphiler Phosphoglyceride mit den lipophilen Resten zueinander und mit den hydrophilen Gruppen dem wässrigen Milieu zugewandt sind. Bestimmte Gruppen, wie Phosphatidylserin (PS)-Reste, findet man gewöhnlich nur auf der dem Zytosol zugewandten Seite. Während dem Vorgang der Apoptose kommt es zur Störung der Asymmetrie der zellulären Lipidmembran, so daß sich die PS-Reste auch auf der Außenseite der Zellmembran nachweisen lassen. Bei Anwesenheit physiologischer Kalziumkonzentrationen bindet Annexin V-FITC an die PS-Reste der Zellmembran und kann mit seiner Fluoreszenzgruppe im Durchflußzytometer ein Signal erzeugen. Während dieser Frühphase der Apoptose ist die Integrität der Zellmembran noch vorhanden, so daß wasserlösliche DNS-Farbstoffe wie Propidiumjodid (PI) nicht ins Zellinnere gelangen können. Man kann so nach Färbung mit Annexin mit PI gegen färben. Eine vitale Zelle lässt sich mit keiner der beiden Substanzen anfärben. Eine frühapoptotische Zelle mit asymmetrischer, intakter Membran färbt sich Annexin-positiv und PI-negativ. Zerfällt sie später, wird ihre Membran wasserdurchlässig und PI gelangt ins Zellinnere, d.h. sie wird zusätzlich PI-positiv, ebenso wie nekrotische Zellen. Die Vorbereitung der Proben erfolgte auf die gleiche Weise wie oben beschrieben. Anschließend wurde das Zellpellet mit 100 µl Annexin-Bindungspuffer resuspendiert, in dem 4 µl Annexin-Stammlösung (0,2 µg/µl) enthalten waren. Die Probe wurde damit bei einer Endkonzentration von 8 µg/ml Annexin für 15 Minuten inkubiert. Danach wurde das Annexin mit PBS herausgewaschen und

die Probe mit 200 µl PI (4 µg in einer Endkonzentration von 20 µg/ml) kurz inkubiert, vortex und am FACS gemessen. Die Messung erfolgte auf den Kanälen FSC, SSC, FL1 und FL2.

4.3.8. XTT-Assay

Es gibt eine Vielzahl an Methodik zur Bestimmung der Lebensfähigkeit (Viabilität) und der Proliferation von Zellpopulationen. Die meisten modernen Assays wurden in Mikrotiterplatten (MTP) mit einem Format von 96 Wells entwickelt, da diese zum einen eine schnelle und simultane Messung vieler Proben erlauben und zum anderen die Menge des benötigten Mediums und die Zahl der Zellen reduzieren. MTP-Assays wurden basierend auf unterschiedlichen Parametern, die mit der Zellviabilität und der Zellproliferation assoziiert sind, entwickelt. Weitere Vorteile beim Einsatz der MTP-Assays gegenüber anderer Methoden sind, daß man keine radioaktiven Isotope benötigt, daß die Absorption streng mit der Zellzahl korreliert, daß kleine Zellzahlen erkannt werden, und daß keine Waschschritte oder zusätzliche Reagenzien vonnöten sind. Die wichtigsten Parameter hierbei sind die metabolische Aktivität und die DNS-Synthese. Verlieren die Zellen die Fähigkeit die benötigte Energie für die metabolische Zellfunktion und für das zelluläre Wachstum zu liefern und beizubehalten, führt dies zwangsläufig zur Schädigung und zum Untergang der Zelle. Auf dieser Tatsache basieren die metabolischen Aktivitätsassays, die gewöhnlich die mitochondriale Aktivität messen. Dabei werden die zu untersuchenden Zellen mit colorimetrischen Substraten inkubiert.

Bei den XTT-Assays findet als colorimetrische Substanz das sogenannte Tetrazolium-Salz XTT (Sodium3-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis) Verwendung, das die Quantifizierung der Zellproliferation, der Zytotoxizität und der Zellaktivität erlaubt. Ursprünglich wurde mit dem XTT-Assay die Medikamentensensitivität von Tumorzelllinien gemessen, mittlerweile wird er auch zur quantitativen Bestimmung der Zellproliferation und der Aktivität als Antwort auf Wachstumsfaktoren und Zytokine wie IL-2 und IL-6 verwendet, ebenso für die Quantifizierung von antiproliferativen oder zytotoxischen Effekten vermittelt durch Tumornekrosefaktoren und zur Messung durch Viren induzierter zytopathischer Effekte. Der Assay basiert auf der Reduzierung des gelben Tetrazolium-Salzes XTT in Anwesenheit eines Elektronenkopplungsreagenz zu einem orangenen löslichen Formazan-Salz durch lebende (viable), metabolisch aktive Zellen. Nach der Reduzierung zum farbigen Formazan-Salz kann dies schnell und einfach in einem konventionellen ELISA-Reader bei 650 nm („scanning mul-

tiwell spectrophotometer“) quantifiziert werden. Der komplette Assay findet, von Beginn an bis zur Messung im ELISA-Reader, in einer Mikrotiterplatte statt.

Nach der Einstellung der Zellen auf die gewünschte Konzentration von einer Millionen Zellen pro ml und Beimpfung mit den Zytostatika, wurden jeweils 100 µl der Zellsuspension auf die einzelnen Wells der 96-Well-Mikrotiterplatte verteilt und mit der schon gebrauchsfertigen XTT-Lösung (vorher musste lediglich das „XTT labeling reagent“ mit dem „Electron-coupling reagent“ vermischt werden), für 4 h in einem Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Während der 4 h Inkubationszeit setzten die lebenden, metabolisch aktiven Zellen das XTT in das wasserlösliche Formazan-Salz um. Die Quantifizierung erfolgte wie oben schon erwähnt mit Hilfe eines ELISA-Readers. Dabei korrelierte die Absorption direkt mit der Zellzahl.

4.3.9. MTT-Assay

Alternativ kann der MTT-Assay benutzt werden, der auf dem selben Prinzip basiert wie der oben beschriebene XTT-Assay. Beim MTT findet das Tetrazoliumsalz 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide Anwendung. Der Versuchsablauf entspricht dem oben beschriebenen. Der Unterschied besteht darin, daß beim MTT ein nicht lösliches Formazansalz entsteht, so daß dieser Assay einen zusätzlichen Inkubationsschritt mit einer Löslichkeitssubstanz für 0,5 h bis 4 h beinhaltet. Die Sensitivität entspricht der des XTT-Assays.

4.3.10. Western Blot

Die im Folgenden beschriebene Methode des Western Blots ermöglicht die Quantifizierung, die Identifizierung und die Bestimmung des Molekulargewichtes bestimmter Antigene. Dies wird dadurch möglich, weil beim Western Blotting Proteine, die vorher mittels Gelelektrophorese getrennt wurden, von einem Gel auf einen festen Träger bzw. auf eine Membran transferiert werden können. Mit spezifischen Reagenzien für bestimmte Aminosäuresequenzen können diese dort sichtbar gemacht und untersucht werden. Bei den hier eingesetzten Reagenzien handelt es sich um Antikörper, die mit spezifischen Antigenbindungsstellen der Zielproteine auf dem festen Träger bzw. der Membran reagieren und somit diese zur Darstellung bringen.

Dem Schritt des eigentlichen Western Blottings gehen noch weitere Schritte voraus. Zunächst müssen die Proben mit den untersuchenden Proteinen erst einmal angesetzt werden und für den Vorgang der Gelelektrophorese vorbereitet werden.

4.3.10.1. Vorbereitung der Proben

Die beiden hier benutzten myeloischen Zelllinien HEL und HL60 wurden wie oben beschrieben kultiviert, gewaschen und mittels einer Neubauer-Zählkammer auf die hier gewünschte Konzentration von 500.000 Zellen pro ml eingestellt. Danach wurden jeweils 10 ml der Zellsuspension auf 50 ml Kulturflaschen verteilt und mit den Einzelkonzentrationen und den Konzentrationen der Zystotikakombinationen beimpft. Zur Analyse der Expression der apoptoserelevanten Proteine wurden die Konzentrationen der Medikamente gewählt, die eine Apoptoserate von 50 % induzierten (inhibiting concentration 50, IC 50). Die Inkubationsdauer betrug 2h, 6h und 24h. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellen bei 1000 Upm für 10 min bei 10°C zentrifugiert und anschließend mit 1 ml PBS resuspendiert und in ein 1 ml Eppendorfcup überführt. Es folgte eine weitere Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei 7500 Upm für 20 min bei 4°C. Der Überstand wurde vorsichtig ohne das Zellpellet zu berühren abpipettiert und verworfen. Das verbliebene Zellpellet wurde unter Vortexen mit 100 – 150 µl Lysispuffer gelöst. Dabei wurden 500 µl Lysispuffer mit 4 µl Benzonase zugegeben. Bei ausreichender Menge des zugegebenen Lysispuffers erhielt man eine klare nicht zähflüssige Lösung. Eine zweiminütige Inkubation bei Raumtemperatur war notwendig, damit die Benzonase wirken und reagieren kann. Die Lysate konnten entweder bei -20°C eingefroren oder dem nächsten Schritt zugeführt werden. Der Proteingehalt der einzelnen Lysate wurde am Photometer über die Messung der OD bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Dazu wurden 2 µl der Lysate mit 198 µl doppeldestilliertem Wasser gemischt und in eine Quarzküvette gefüllt. Luftblasen sollten vermieden werden, um den Lichtstrahl nicht abzulenken und damit das Messergebnis zu verfälschen. Um in allen Proben für die Gelelektrophorese einen einheitlichen Proteingehalt zu erhalten, wurde die Menge des Lysates für die Proben und die Menge des Wassers mit der untenstehenden Formel berechnet.

$$1 \mu\text{l Mercaptoethanol} + 2 \mu\text{l Bromphenolblau} + 1/\text{OD} + x \mu\text{l Wasser} = 20 \mu\text{l Probe}$$

Nach Erhalt der Proben für die Gelelektrophorese, wurden diese zur Denaturierung der Proteine in einer PCR-Maschine bei 95°C für 5 Minuten erhitzt, sie standen dann für die Gelelektrophorese zur Verfügung.

Lysate und Proben können bei -80°C eingefroren und je nach Bedarf auf Eis wieder aufgetaut werden. Doch sollte man dies nicht allzu oft tun, da es zu einer Inaktivierung der Benzonase kommen kann.

4.3.10.2. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Mit der SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese kann man Proteine in ihre einzelnen Polypeptid-Einheiten auftrennen. Die Menge der SDS-Bindungen ist proportional zu dem Molekulargewicht der Polypeptide und ist unabhängig von ihrer Sequenz. Die SDS-Polypeptid-Komplexe migrieren durch das Polyacrylamid-Gel in Übereinstimmung der Größe des Polypeptides. Durch Verwendung von Makern mit bekannten Molekulargewichten ist es möglich, das Molekulargewicht der Polypeptidketten abzuschätzen. Durch den zwischen zwei Elektroden laufenden elektrischen Strom entsteht eine Grenze, an welcher die SDS- Polyacrylamid-Komplexe entlang laufen. Die Polypeptide durchwandern zunächst ein sogenanntes Sammelgel mit hoher Porosität und lagern sich in einer dünnen Schicht oberhalb des Trennungsgels ab. Die in dem Sammelgel enthaltenen Chlorid-Ionen formen die vorausgehende Front der wandernden Grenze, während die enthaltenden Glycerinmoleküle das Ende bilden. Zwischen den Beiden befindet sich eine Zone geringer Leitfähigkeit und einem starken Spannungsgradienten, welcher die Polypeptide vorantreibt und in der oberen Phase des Trennungsgels sammelt. Der höhere pH-Wert des Trennungsgels fördert die Ionisierung der Glycerine und die daraus entstehenden Glycerinionen migrieren durch die gesammelten Polypeptide und wandern durch das Trennungsgel. Die SDS-Polypeptid-Komplexe wandern durch das Trennungsgel und werden ihrer Größe nach getrennt. Die Polyacrylamid-Gele sind aus Ketten von polymerisierten Acrylamiden zusammengesetzt. Die Effektivität der Trennung ist abhängig von den Konzentrationen der Polyacrylamide, die zur Gießung der Gele verwendet werden und von der Anzahl der Cross-Links.

Acrylamid-Konzentration (%)	Linearer Trennbereich (kD)
15,0	12-43
10,0	16-68
7,5	36-94
5,0	57-212

Trennbereiche verschiedener Polyacrylamidgele. Aus: Molecular Cloning.⁶³

4.3.10.3. Gele gießen

Als erstes wurden entsprechend der Herstellerinstruktion die beiden Glasplatten aufeinandergelegt und in eine Gießvorrichtung eingesetzt und befestigt. Dabei ist darauf zu achten, daß die beiden Glasplatten bündig aufeinander liegen, da sonst die Gefahr des Auslaufens besteht. Das zunächst flüssige Gel wurde mit der gewünschten Konzentration der Acrylamide nach oben stehendem Rezept in einem 50 ml Falcon - Tube angesetzt. Nach Zugabe des die Polymerisation startenden TENMED wurde das Gel zügig in den Spalt zwischen den beiden Glasplatten eingefüllt, so daß genügend Platz für das Sammelgel blieb (Länge der Zähne des Kammes plus 1 cm). Die Bildung von Luftblasen sollte vermieden werden, da das Auftrennen der Proteine durch die Luftblasen beeinträchtigt werden kann. Um eine gerade Linie zu erhalten wurde das Trennungsgel mit Wasser überschichtet, das mit einem Filterpapier nach Beendigung der Polymerisation entfernt wurde. In vertikaler Stellung bei Raumtemperatur dauert die Polymerisation ca. 20-30 min. Die Zeit wurde zum Ansetzen des Sammelgels entsprechend des Rezeptes genutzt. Nach Beendigung der Polymerisation des Trennungsgels wurde dieses mit dem Sammelgel zügig überschichtet. Die Teflonkämme wurden vorsichtig ohne Bildung von Luftblasen in das Sammelgel gesteckt. Die Polymerisation dauerte auch hier bei Raumtemperatur in vertikaler Stellung 20-30 min. Nach Abschluss der Polymerisation wurden die Teflonkämme vorsichtig, ohne die Kammern zu beschädigen, entfernt. Mit einer Wasser gefüllten Spritzflasche wurden die unpolymersierten Acrylamidreste entfernt. Zusätzlich konnte man die einzelnen Kammern mit einem dünnen Streifen Filterpapier reinigen. Die Glasplatten mit den Gelen kamen in eine mit Running-Puffer (Tris-glycine-elektrophoresis-Puffer) gefüllte Elektrophoreseapparatur. Die Gele sollten vollständig mit dem Laufpuffer bedeckt sein. Die Proben wurden vor dem Einfüllen in die Kammern kurz in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, um die gesamten 20 µl der Probe mit einer Hamilton Mikroliter Spritze

aufnehmen zu können. Das Einfüllen sollte langsam und vorsichtig erfolgen, da in der Spritze enthaltene Luftblasen die Probe aus der Kammer pressen können. Nach jeder Probe wurde die Mikroliter Spritze mit Laufpuffer oder mit destilliertem Wasser gereinigt. In unbenutzte Kammern wurden 20 µl Laufpuffer eingefüllt. Die Gelelektrophoreseapparatur wurde an ein elektrisches Transformationsgerät („power supply“) angeschlossen. Die Stromstärke wurde auf 100-110 mA und die Spannung auf 150 Volt eingestellt. Die Auftrennung war beendet, sobald die mit Bromphenolblau gefärbten Proben den Boden des Trennungsgels (nach circa 90 min) erreicht hatten. Die Glasplatten mit den Gelen wurden aus der Apparatur genommen und mit einem „Einwegskalpell“ voneinander getrennt.

Danach erfolgte der Transfer der Proteine von den SDS-Polyacrylamid-Gelen auf einen soliden Träger (Western Blotting).

4.3.10.4. Western Blotting

Um mit den aufgetrennten Proteinen weiterarbeiten zu können, mussten diese zunächst mittels Western Blotting auf einen soliden Träger übertragen werden. Als solider Träger fand hier eine Nitrocellulosemembran Gebrauch, die mit dem Gel in einem Sandwichverfahren zwischen mehreren Schichten von Whatman 3 MM Papieren geschichtet wurde.

Pro Gel benötigte man sechs gleich große Stücke des Whatmann 3 MM Papiers (10 cm x 7,5 cm) und eine Nitrocellulosemembran (9 cm x 6,5 cm). Die Whatman Papiere sollten vor Gebrauch 20-30 min in Transferpuffer gelegt werden, welcher Tris, Glycine, SDS und Methanol enthält. Nach Reinigung des Blottinggeräts mit doppeldestilliertem Wasser und leichtem Anfeuchten mit dem Transferpuffer wurden zuerst drei Schichten des Whatmann 3 MM Papiers auf die Elektrode gelegt. Dabei sollte man grundsätzlich darauf achten, daß sowohl das Gel als auch die Nitrocellulosemembran vollständig von dem Papier bedeckt sind, da es sonst zu Störungen des Transfers kommen kann. Daneben kann es zu einem Kurzschluss kommen, wenn sich die Papiere zweier oder mehrerer Sandwichs berühren oder überlappen. Die Nitrocellulosemembran sollte immer mit einer Pinzette angefasst werden, um die Oberfläche nicht zu verunreinigen und damit den Vorgang zu beeinträchtigen. Auf die unteren drei Schichten des Whatmann Papiers wurde dann die Membran aufgelegt und darauf das Gel, welches vorher kurz in den Transferpuffer getaucht wurde. Auf das Gel kamen die drei letzten Schichten der Whatmann Papiere. Mittels einer Glaspipette wurde das Sandwich geglättet und die Luftblasen beseitigt. Nach Entfernung aller Luftblasen wurde die obere Elektrode auf das Sandwich aufgesetzt und festgedrückt und mit dem Deckel fest verschlossen. Das Blottingge-

rät wurde an ein Transformationsgerät angeschlossen und eine Stromstärke von 110 mA und eine Spannung von 10-20 Volt pro Gel eingestellt. Die Dauer des Transfers lag bei 60-90 Minuten. Nach Beendigung des Vorgangs wurde das Gerät ausgeschaltet, der Deckel und die obere Elektrode vorsichtig abgehoben und die oberen drei Filterpapiere entfernt. Die Gele kamen über Nacht zum Einfärben in mit Coomassie Blue gefüllte Plastischälchen, um die Qualität und Quantität der Polypeptidwanderung durch das Trennungsgel beurteilen zu können. Je nach Antikörper wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembranen entweder für eine Stunde oder über Nacht mit einer 2-5%-igen Milchpulver-Lösung geblockt.

4.3.10.5. Bindung des primären Antikörpers an das Zielprotein

Nachdem geblockt wurde, wurde die Milchpulver-Lösung dekantiert und die Nitrocellulosemembran kurz mit TBST gewaschen. Der entsprechende primäre Antikörper wurde in TBST gelöst. 10 ml der Antikörper-Lösung wurden auf die Membran gegeben und für mindestens drei Stunden auf einem wippenden Misch- und Schüttelgerät bei langsamer Stufe und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Antikörperlösung verworfen oder zur weiteren Nutzung aufbewahrt. Die Blots wurden danach viermal für jeweils 5 Minuten mit TBST auf einem Plattformmixer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift folgte die mindestens einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Anti-Immunglobulin). Am Ende wurden die Blots erneut viermal für jeweils fünf Minuten mit TBST gewaschen. Die Blots konnten danach entwickelt werden.

4.3.10.6. Entwicklung der Blots unter Verwendung chromogener Substrate mit Enzym gekoppelten Antikörpern

Man benötigte für diese Darstellungsmethode drei Lösungen, und zwar 5-bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphat (BCIP), nitro-blue-tetrazolium (NBT) und einen alkalischen Phosphatase-Puffer (AP). Pro 10 ml des Alkalischen Phosphatase-Puffers waren 66 µl NBT und 33 µl BCIP vonnöten, diese wurden zusammen in einem 50 ml Falcon Tube gemischt. Da die Substanzen lichtempfindlich sind, sollte das Falcon Tube mit Aluminiumfolie umwickelt werden. Nach dem letzten Waschschrift wurde das TBST dekantiert und jeder Blot mit 10 ml der Entwicklungslösung überschichtet. Die Schälchen mit den Blots wurden leicht hin und her ge-

schwenkt, um die Lösung gleichmäßig zu verteilen und die gesamte Oberfläche der Blots zu benetzen. Die Entwicklungszeit betrug je nach verwendetem Antikörper zwischen 5 und 10 Minuten. Nach Erreichen der gewünschten Intensität der Banden erfolgte das Dekantieren der Lösung. Die Blots wurden anschließend ein- bis zweimal mit doppeldestilliertem Wasser gewaschen, um eventuelle Reste der AP-Lösung zu entfernen. Zwischen mehreren Papiertüchern wurden die Blots über Nacht getrocknet. Nach dem Trocknen wurden sie zum Schutz in Folie eingeschweißt.

4.3.10.7. Entfärben der Gele

Wie oben erwähnt, wurden die Gele in Coomassie Blue über Nacht eingefärbt, um die Qualität und die Quantität der Wanderung der Polypeptide durch das Gel beurteilen zu können. Die eingefärbten Gele wurden am nächsten Tag mit Coomassie Destain entfärbt, so daß am Ende des Entfärbens nur noch die Banden im Gel zu erkennen waren. Um eine gleichmäßige Entfärbung zu erhalten, sollte man die Schälchen auf einem Plattformmixer rotieren lassen. Das Coomassie Destain wurde zwei- bis dreimal gewechselt. Die Dauer des Entfärbens betrug 3-5 Stunden. Die nach dem Entfärben in Wasser eingelegten Gele, zur vollständigen Entfernung der Essigsäure, wurden zwischen zwei speziell zur Trocknung von Gelen geeignete Folien gelegt und in einen Rahmen gespannt. Die Folie sollte Falten und Wasserblasen frei sein, da es sonst zum Reißen der Gele kommen kann.

5. Ergebnisse der Experimente

5.1. Beeinflussung des intrazellulären Metabolismus von 2-CdA durch Gemcitabin in Zelllinien

Der Einfluss des Pyrimidinanalogon Gemcitabin auf den intrazellulären Metabolismus des Purinanalogon 2-CdA wurde mit der Hochflüssigkeitschromatographie an den zwei myeloiden Zelllinien HEL und HL 60 und an den zwei lymphatischen Zelllinien JURKAT und HUT 78 untersucht. Bei diesem Experiment wurden die beiden Zytostatika zunächst gleichzeitig appliziert, und die Zellen damit für 1 h, 3 h, 5 h und 8 h inkubiert. Danach wurde derselbe Versuch angesetzt mit sequentieller Applikation der beiden Substanzen. Konsekutiv bedeutete in diesem Fall, daß die Zellen der vier Zelllinien zuerst für drei Stunden mit Gemcitabin inkubiert wurden mit anschließendem dreimaligen Waschen und erneuter Inkubation für 21 h in Medikamenten freiem Medium (im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂). Nach Beendigung erfolgte die Zugabe des 2-CdA. Gemessen wurde auch hier nach 1 h, 3 h, 5 h und 8 h. Bei den Versuchen wurden zwei verschiedene Abhängigkeiten, die den Metabolismus des 2-CdA beeinflussen könnten, untersucht. Interessant war zum einen der Zusammenhang zwischen der Menge der erzielten aktiven Metabolite des 2-CdA und der Dosissteigerung des Gemcitabin (zwischen 1 µg/ml und 4 µg/ml, Abbildung 2) und zum anderen der Verlauf über die Zeit (Abbildung 1). Das Ergebnis des Experimentes mit simultaner Applikation der Zytostatika zeigte eine klare Abnahme der intrazellulären 2-CdA-Metabolite bei Steigerung der Dosierung von Gemcitabin, wie in Abbildung 2 dargestellt.

Dabei verhielten sich alle vier Zelllinien gleich. Wie in der Abbildung 1 als Beispiel bei den HEL-Zellen dargestellt, waren bei einer Dosis von 0,05 µg/ml 2-CdA und 1 µg/ml dFdC über eine Inkubationszeit von 5 h 103 cts des 2-CdA-5'-triphosphat zumessen. Nach Erhöhung der Dosis von dFdC auf 2 µg/ml und auf 3 µg/ml zeigte sich eine Abnahme der 2-CdA-5'-triphosphate und war bei einer weiteren Dosissteigerung um 1 µg/ml auf insgesamt 4 µg/ml nicht mehr zumessen. Fast identische Kurvenverläufe wurden auch bei den beiden anderen Metaboliten (2-CdA-5'-diphosphat und 2-CdA-5'-monophosphat) erzielt, wobei die Spiegel der Monophosphate bei allen Versuchen am höchsten lagen. Ein cts entsprach dabei einer Aktivität von 1 Bq, die spezifische Aktivität des [³H]-2-CdA betrug 444 GBq/mMol. Das gleiche Bild zeigte sich auch bei den drei anderen Zelllinien. Der Effekt, der sich hier durch

	1 h	3 h	5 h	8 h
2-CdAMP	212,5	202	236	241,5
2-CdADP	16	11	67	86
2-CdATP	47	45,5	103	98,5

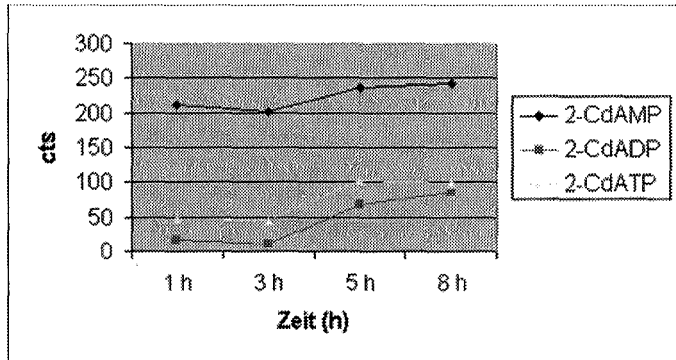


Abb. 1: Kombination von 0,05 µg/ml 2-CdA mit 1,00 µg/ml Gemcitabine

	0 µg/ml Gem.	1 µg/ml Gem.	2 µg/ml Gem.	4 µg/ml Gem.
2-CdAMP	316	236	92,5	71,5
2-CdADP	81	67	25,5	0
2-CdATP	163	103	33	0

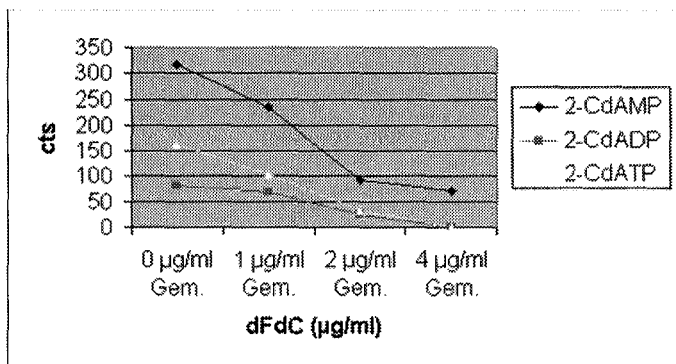


Abb. 2: Kombination von 0,05 µg/ml 2-CdA
Gemessen nach 5 h

die Kombination der beiden Substanzen ergab, lässt sich als Hemmung interpretieren, d.h. daß sich die Wirkung des 2-CdA durch die Kombination mit Gemcitabin nicht steigern ließ, sondern zu einer Hemmung der intrazellulären Phosphorylierung des 2-CdA in seine aktiven und damit wirksamen Metabolite führte. Bei simultaner Inkubation der Zellen mit den Chemotherapeutika nahm mit zunehmender Inkubationszeit dieser Effekt ab. In Abhängigkeit vom Ursprung der Zelllinie (myeloisch oder lymphatisch), zeigten sich hinsichtlich der Zeit nur leichte Variationen des intrazellulären 2-CdA-Metabolismus. So wurde beispielsweise bei den HEL-Zellen bei simultaner Gabe nach einstündiger Inkubation mit 0,05 µg/ml 2-CdA und mit 1 µg/ml dFdC 47 cts des 2-CdA-5'-triphosphats gemessen und nach 8 h 98,5 cts. Im Gegensatz dazu wurden bei den HUT 78-Zellen nach 1 h, 3 h und 5 h mit 0,1 µg/ml 2-CdA und 4 µg/ml dFdC 0 cts des 2-CdA-5'-triphosphates gemessen und 10 cts nach 8 h. Ganz anders stellten sich die Ergebnisse im zweiten Versuchsansatz dar, bei welchem die Zellen sequentiell mit den Medikamenten inkubiert wurden. Wie in Abbildung 3 und 4 dargestellt, wurde die Hemmung der Phosphorylation des 2-CdA in seine aktiven Metabolite durch die konsekutive Gabe aufgehoben. In der oberen Abbildung 3 wird die Hemmung des Metabolismus bei simultaner Gabe am Beispiel der JURKAT-Zellen (im Bereich 1 µg/ml und 4 µg/ml, gemessen nach 5 h) dargestellt, zum Vergleich erkennt man in der unteren Abbildung 4, daß bei konsekutiver Gabe der Spiegel des 2-CdA-5'-triphosphates mehr als 100 % der Kontrolle (2-CdA gegeben als Einzelsubstanz) betrug. Zusammenfassend lässt sich sagen, daß bei Zunahme der Dosis von Gemcitabin und bei Zunahme der Inkubationszeit der intrazelluläre Metabolismus von 2-CdA in seine aktiven und damit wirksamen Metabolite sich nur dann steigern ließ, wenn die Zellen mit beiden Substanzen konsekutiv und nicht simultan inkubiert wurden.

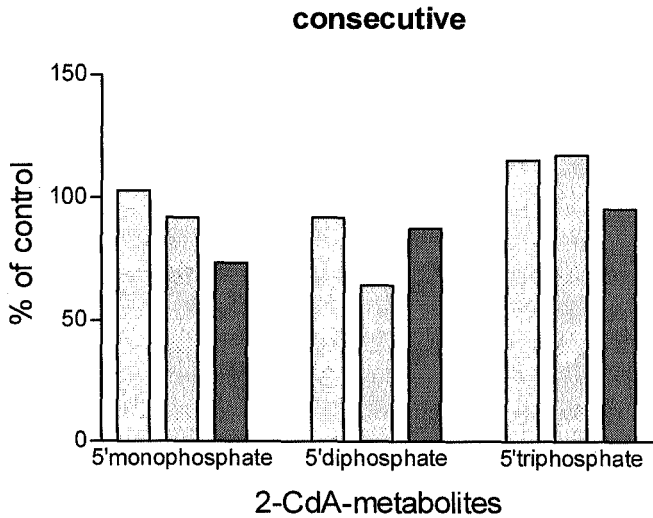
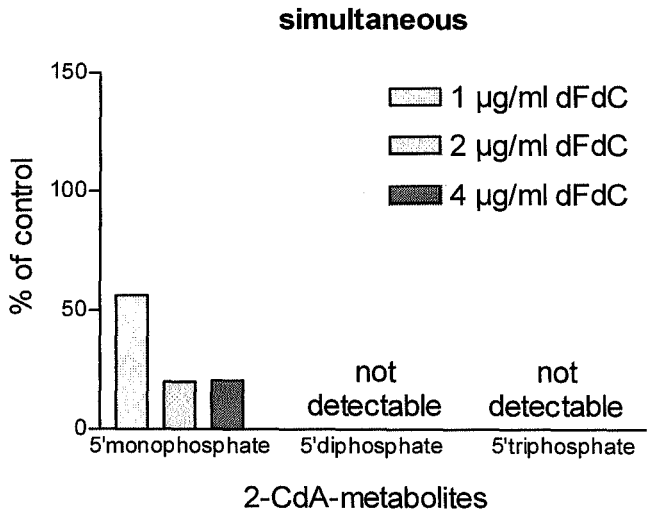


Abb. 3 und 4: Zelllinie: JURKAT
Simultane und konsekutive Applikation

AMP	ADP	ATP	
1129,16	95,93	84,08	1 h
935,89	215,85	275,31	3 h
1272,96	417,44	511,87	5 h
1711,7	416,02	478,74	8 h
2212	883,05	656,21	24 h

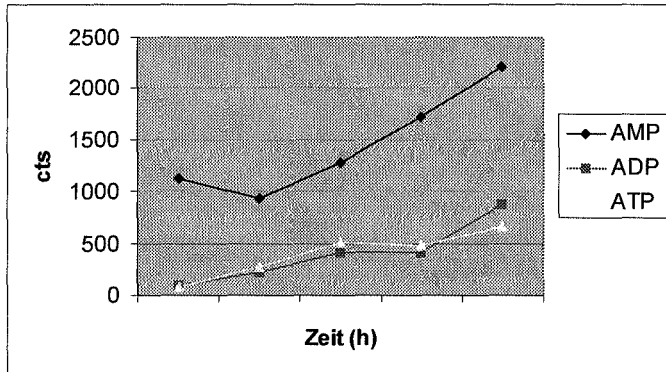


Abb. 5: Normalpersonen (n=4)
2-CdA-Konzentration: 4,00 µg/ml

AMP	ADP	ATP	
391,92	52,19	41,51	1 h
165,57	88,55	103,73	3 h
298,45	87,55	128,18	5 h
909,22	221,06	226,04	8 h
1125,81	353,95	295,47	24 h

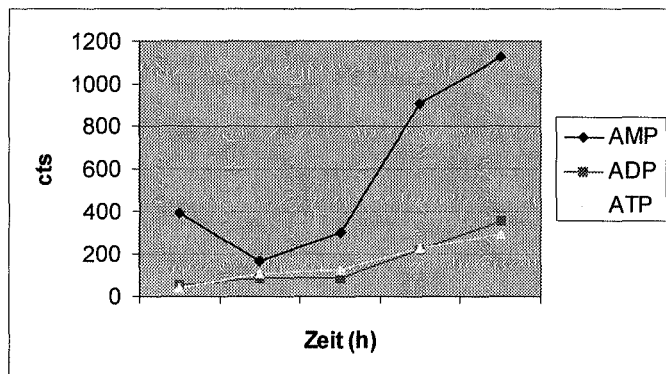


Abb. 6: Normalpersonen (n=4)
2-CdA-Konzentration: 0,05 µg/ml

5.2. Intrazellulärer Metabolismus von 2-CdA in mononukleären Zellen

Die intrazelluläre Phosphorylierung von 2-CdA in seine aktiven Metabolite 2-CdA-5'-mono-, di- und triphosphat in neoplastischen mononukleären Zellen von Patienten mit niedrigmalignen Lymphomen (CLL, n=4) und in mononukleären Zellen gesunder Probanden (n=4) wurde mit Hilfe der Hochflüssigkeitschromatographie erfasst. Gemessen wurde die Abhängigkeit des Metabolismus von der Zeit (Pharmakokinetik). Die Zellen wurden dafür unterschiedlich lange mit 2-CdA inkubiert (1 h, 3 h, 5 h, 8 h und 24 h). Untersucht wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen: 0,05 µg/ml und 0,4 µg/ml 2-CdA, um eventuelle Abhängigkeiten von der Medikamentenkonzentration zu erfassen. In den zwei Abbildungen 5 und 6 sind die zusammengefassten Kurven der gesunden Probanden dargestellt, einmal mit einer Konzentration von 0,05 µg/ml und zum anderen mit einer Konzentration von 4 µg/ml 2-CdA.

In den Abbildungen 7 und 8 werden die Kurven der Patienten mit den niedrigmalignen Lymphomen aufgeführt. Wie die Kurven zeigen, fand sich nur ein flacher Anstieg der Kurven für die Erhöhung der intrazellulären Konzentrationen der aktiven Metabolite des 2-CdA in Abhängigkeit von der extrazellulären Konzentration von Cladribin im Bereich von 0,05 µg/ml und 0,4 µg/ml. In allen der acht durchgeführten Versuche wurde dieser flache Anstieg der Kurven von 2-CdA-5'-triphosphat gefunden. Das Verhältnis zwischen der Steigung für 2-CdA-5'-triphosphat und der des 2-CdA-5'-monophosphat stimmte überein und rangiert zwischen 0,1 und 0,14. Dabei war der Spiegel der cts (counts per second) des 2-CdA-5'-monophosphat generell höher als der Spiegel der cts des 2-CdA-5'-triphosphat. Zwischen der Phosphorylierung von 2-CdA zum 2-CdA-5'-diphosphat und 2-CdA-5'-triphosphat wurde kein signifikanter Unterschied beobachtet. Die intrazelluläre Phosphorylation von 2-CdA nahm mit zunehmender Konzentration des Medikamentes und mit zunehmender Inkubationszeit signifikant zu, sowohl in den Lymphozyten der gesunden Probanden als auch in den neoplastischen Lymphozyten der Patienten mit den niedrigmalignen Lymphomen. Die mononukleären Zellen eines Patienten mit CLL zeigten keinerlei messbare Metabolite des 2-CdA.

AMP	ADP	ATP	
597,65	62,92	80,17	1 h
752,08	134,32	100,33	3 h
758,72	115,44	109,93	5 h
1282,49	159,43	273,28	8 h
954,13	150,26	212,73	24 h

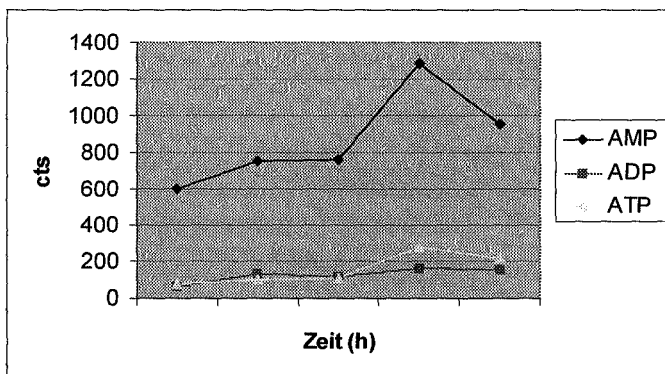


Abb. 7: Patienten mit CLL (n=4)
2-CdA-Konzentration: 4,00 µg/ml

AMP	ADP	ATP	
231,27	33,05	49,89	1 h
231,53	39,56	43,57	3 h
356,13	62,76	56,2	5 h
472,8	101,85	94,17	8 h
576,41	131,98	137,84	24 h

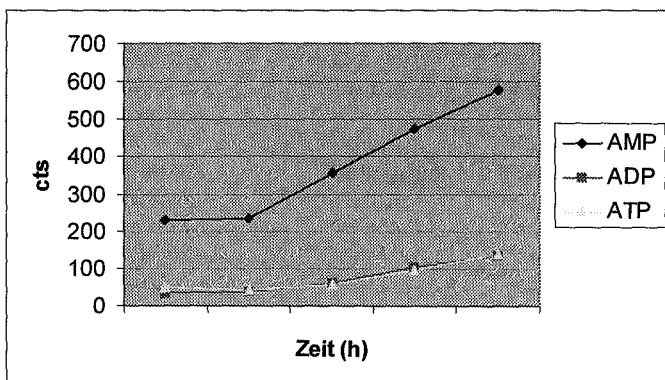


Abb. 8: Patienten mit CLL (n=4)
2-CdA-Konzentration: 0,05 µg/ml

5.3. Einfluss verschiedener Zytostatika auf die Apoptoserate, verabreicht als Einzelsubstanz und in Kombination

5.3.1. Ergebnisse der Einzelsubstanzen

Wie schon in den vorherigen Versuchen, fanden auch hier die beiden myeloischen Zelllinien HL 60 und HEL Verwendung. Bei diesem Experiment wurde zunächst die Wirkung der einzelnen Medikamente auf die Apoptoserate über die Zeit betrachtet, um so eine Dosiswirkungsbeziehung zu erhalten. Gemessen wurde nach 24 h, 48 h und 72 h. Die Erkennung von apoptotischen Zellen und die Bestimmung der Apoptoserate erfolgte mit der FACScan - Methode (fluorescence-activated cell sorter) am Durchflußzytometer mit der Lysis II Software von Becton Dickinson. Verwendet wurde hierbei das fluoreszierende an die DNA bindende Substrat 7-AAD (7-aminoactinomycin D). Gemessen wurden zunächst die Apoptoseraten, welche durch die Gabe der einzelnen Medikamente erzielt wurden. Danach erfolgte die kombinierte Applikation von Cytarabin plus Bendamustin, Cytarabin plus Cladribin und Cytarabin plus Fludarabin, dabei wurden wie in den Methoden schon erläutert die Konzentrationen der einzelnen Kombinationspartner um den gleichen Faktor erhöht.

In den ersten vier Abbildungen sind zunächst die Dosiswirkungskurven der einzelnen Medikamente, verabreicht als Einzelsubstanz, dargestellt. Beispiele für die gemessenen Werte nach 72 h konnten nicht ausgewertet werden, aufgrund der zu hohen Spontanapoptose.

Wie in Abbildung 1 erkennbar, ließ sich die Wirkung von 2-CdA durch die Steigerung der Dosis maximieren. So erhielt man bei einer Dosis von 0,01 µg/ml 2-CdA eine Apoptoserate von nur 5,19 % (abzüglich der Spontanapoptoserate). Im Gegensatz dazu konnte bei der maximalen Dosis von 2,0 µg/ml 2-CdA eine Apoptoserate von 32,46 % erzielt werden. Die Werte wurden bei der HEL-Zelllinie nach einer Inkubationszeit von 24 h gemessen. Im Vergleich zur zweiten myeloischen Zelllinie HL60 zeigten sich nur leichte Variationen im Kurvenverlauf, so daß dieser hier nicht aufgeführt wird.

Abbildung 2 zeigt die Dosiswirkungskurve von Bendamustin nach 24 h am Beispiel der HL60 Zellen. Bei einer Einzeldosis von 10 µg/ml ließ sich eine Apoptoserate von 17,42 % erzielen. Die Wirkung auf die Apoptoserate ließ sich über Werte von 27,57 % und 36,55 % auf 49,82 % steigern, wobei die Dosis von 10µg/ml auf maximal 200 µg/ml erhöht wurde.

In Abbildung 3 ist der Effekt von Fludarabin auf die HEL Zellen dokumentiert, gemessen wurde nach 48 h. Auch hier lässt sich der Anstieg der Apoptoserate durch Steigerung der Konzentration erzielen, und zwar von 4,01 % bei 0,6 µg/ml über 35,44 % bei 4,2 µg/ml bis zu

47,35 % bei der maximalen Dosis von 12,0 µg/ml. Anders stellt sich der Kurvenverlauf bei dem Chemotherapeutikum Ara-C dar, hier ließ sich auch durch die Erhöhung der Dosis keine ansteigende Dosiswirkungskurve erreichen (Abbildung 4). Die Werte lagen alle um die 60 %. Eine Verlängerung der Inkubationszeit führte ebenfalls zu keiner Veränderung des Ergebnisses. Vergleicht man beide Zelllinien miteinander, zeigten sich im Kurvenverlauf keine großen Differenzen, nur in der Quantität der Apoptoserate differierten sie geringfügig. So daß für beide Zelllinien jeweils nur eine Abbildung für jedes Chemotherapeutikum demonstriert wird. Zusammenfassend kann man sagen, daß sich die Apoptoserate proportional zur Steigerung der Dosis und zur Verlängerung der Inkubationszeit maximieren ließ. Bei dem Chemotherapeutikum Ara-C ließ sich weder durch Steigerung noch durch Verlängerung der Inkubationsdauer eine Dosiswirkungskurve bezüglich der Apoptoserate erzielen.

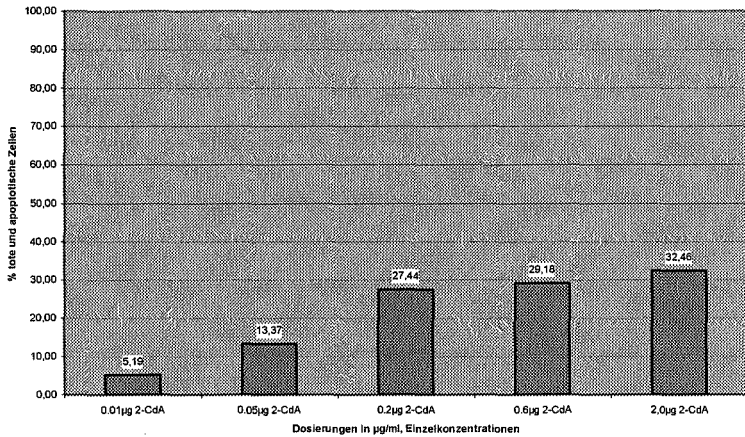


Abb. 1: Dosiswirkungskurve von 2-CdA
Zelllinie: HEL
Inkubationszeit: 24 h

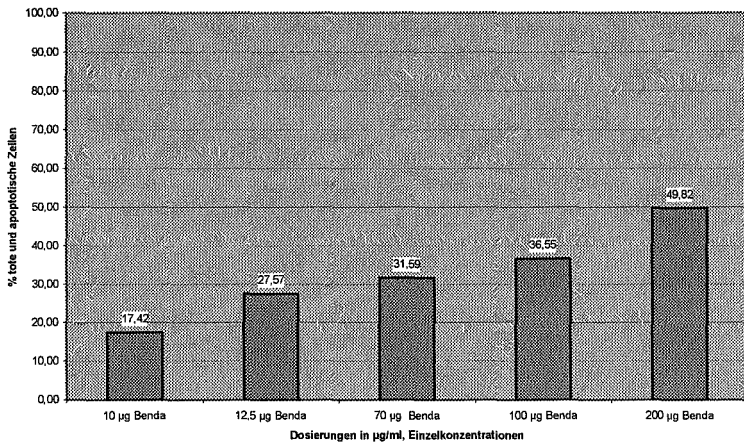


Abb. 2: Dosiswirkungskurve von Bendamustin
Zelllinie: HL 60
Inkubationszeit: 24 h

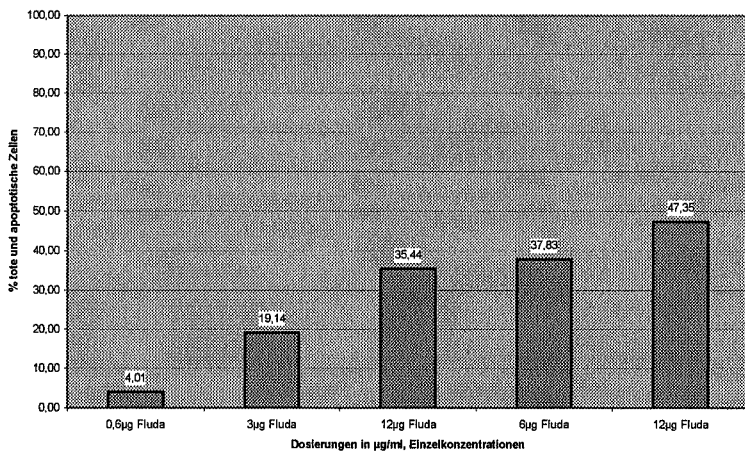


Abb. 3: Dosiswirkungskurve von Fludarabin
Zelllinie: HEL
Inkubationszeit: 48 h

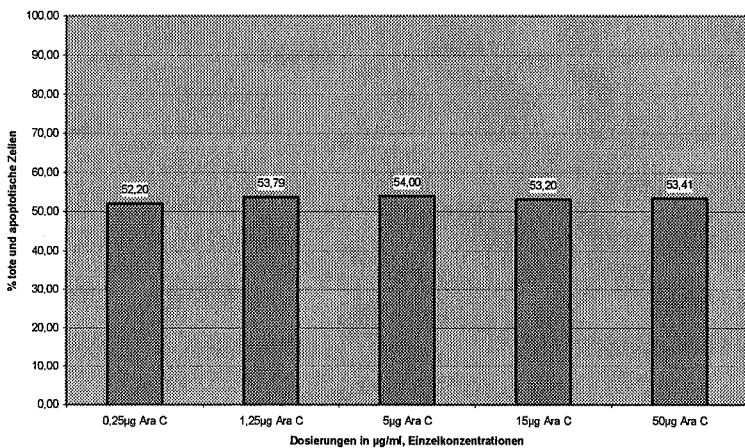


Abb. 4: Dosiswirkungskurve von Ara-C
Zelllinie: HL 60
Inkubationszeit: 48 h

5.3.2. Ergebnisse der Medikamentenkombinationen

Bei den nachstehenden Ergebnissen wurden die Einflüsse auf die Apoptoserate der Medikamentenkombinationen Cytarabin plus Fludarabin, Cytarabin plus 2-CdA und Cytarabin plus Bendamustin untersucht. Ermittelt wurde die Apoptoserate am Durchflußzytometer unter Verwendung der fluoreszierenden Substanz 7-AAD (7-aminoactinomycin D). Bei diesem Experiment erfolgte die Applikation beider Zytostatika der jeweiligen Kombination zunächst simultan mit anschließender Inkubation für 24 h, 48 h und 72 h bei 37°C und 5 % CO₂. Der zweite Versuchsansatz unterschied sich darin, daß die beiden Medikamente konsekutiv appliziert wurden. Konsekutiv bedeutete in diesem Fall, dass die Zellen der zwei Zelllinien zunächst für drei Stunden mit Ara-C inkubiert, anschließend dreimal gewaschen und dann erneut für 21 h in medikamentenfreiem Medium (im Brutschrank) inkubiert wurden. Nach Beendigung erfolgte die Zugabe des zweiten Chemotherapeutikums. Gemessen wurde auch hier die Apoptoserate nach 24 h, 48 h und 72 h am Durchflußzytometer. Da man mit 7-AAD nekrotische von apoptotischen Zellen nicht unterscheiden kann, wurden zur Reproduktion der erhaltenen Ergebnisse bezüglich der Induktion der Apoptose die Versuche anschließend mit Annexin V wiederholt. Obwohl mittlerweile bekannt ist, daß Purin- und Pyrimidinanaloga durch die Induktion der Apoptose zum Untergang der Zellen führen. Ein wichtiger Schritt im Ablauf der Apoptose ist der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials (MMP). Mit dem mitochondrialen Farbstoff JC-1 ist es möglich durch Bestimmung des MMP apoptotische von lebenden Zellen zu unterscheiden. Die Messung erfolgte ebenfalls am Durchflußzytometer. Parallel zur Bestimmung der Apoptose wurde auch der Einfluss der Medikamente auf das Proliferationsverhalten der Zellen eruiert. Zur Bestimmung der Proliferationsrate eignen sich sogenannte Proliferationsassays (XTT,MTT), welche die mitochondriale Aktivität messen. Die entsprechenden Ergebnisse werden anschließend demonstriert. Zunächst werden die Ergebnisse der Messungen bei simultaner Gabe der Kombination Ara-C und Fludarabin gezeigt. Der antagonistische Effekt dieser Kombination bei gleichzeitiger Gabe ist eindeutig in Abbildung 1 dargestellt. Bei der hier gewählten Darstellungsweise der Apoptoseraten in % ist deutlich auszumachen, daß die gemessenen Werte (Reihe 1) weit unter den Erwarteten (Reihe 2) lagen, so lag die erzielte Rate bei einer Kombination von 12 µg/ml Fludarabin und 5 µg/ml Ara-C bei 51,73 % (abzüglich der Spontanapoptoserate), bei dem eigentlich zu erwarteten Synergismus würde der Wert bei 100 % liegen. Der erwartete Wert ergab sich durch die Addition der Resultate der Zytostatika gegeben als Einzelsubstanz.

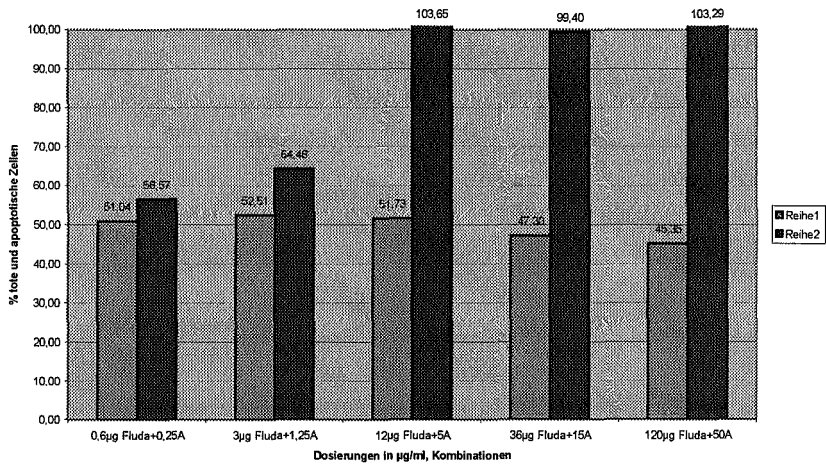


Abb. 1: Simultane Inkubation von Ara-C und Fludarabin
 Reihe 1: gemessene Werte (nach 48 h)
 Reihe 2: errechnete Werte
 Zelllinie: HEL

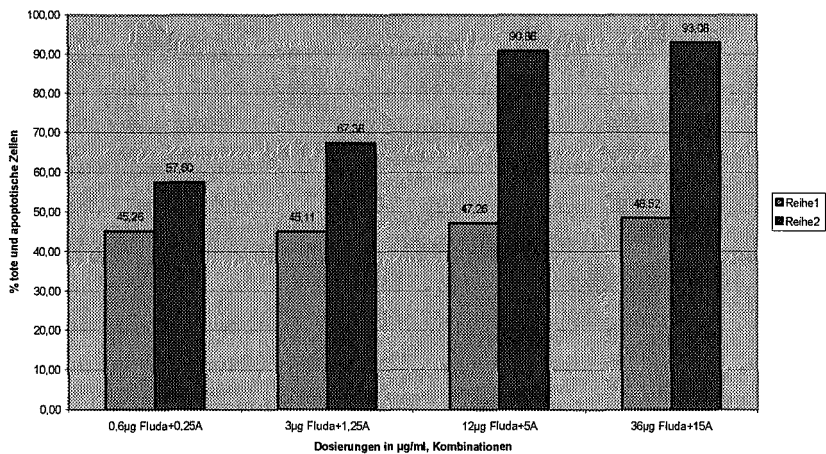


Abb. 2: Simultane Inkubation von Ara-C und Fludarabin
 Reihe 1: gemessene Werte (nach 24 h)
 Reihe 2: errechnete Werte
 Zelllinie: HL 60

In der Abbildung 1 wird offensichtlich, daß bei Steigerung der Dosis beider Partner um den gleichen Faktor der Unterschied zwischen gemessenem und erwartetem Ergebnis größer wurde. So konnte bei der niedrigsten Kombination von 0,6 µg/ml Fludarabin und 0,25 µg/ml Ara-C eine Differenz von 5,53 % beobachtet werden, während bei den maximal gewählten Konzentrationen der beiden Partner ein Unterschied von über 50 % zu ermitteln war. Die vorliegende Abbildung 1 zeigt den Kurvenverlauf der HEL Zellen nach einer Inkubationszeit von 48 h. Ein ähnliches Bild zeigt sich in der zweiten Abbildung, wobei hier nach 24 h gemessen wurde (HL 60 Zelllinie), auch hier zeigte sich ein antagonistischer Effekt. In den folgenden beiden Abbildungen 3 und 4 sind die Ergebnisse der gleichzeitigen Applikation von Ara-C mit Bendamustin bei den HEL Zellen angegeben. In der oberen Abbildung 3 ist zu sehen, daß bei der Kombination von Ara-C und Bendamustin ebenfalls kein synergistischer Effekt zu erzielen war. Die erhaltenen Werte lagen bei jeder gewählten Dosierung unterhalb des zu erwartenden Resultates. So zeigte sich bei der gleichzeitigen Applikation von 10 µg/ml Bendamustin und 0,25 µg/ml Ara-C eine Apoptoserate von nur 26,84 % statt der hier erwarteten 35,56 %, ein ähnliches Bild erhielt man bei der Verabreichung der maximalen Dosis von 200 µg/ml Bendamustin und 5 µg/ml Ara-C, gemessen wurden 40,75 % gegenüber 55,27 %. In gleicher Weise verhielten sich die HL 60 Zellen mit nur geringen quantitativen Differenzen. In der letzten Abbildung 4 ist der Effekt der Kombination von Ara-C mit 2-Cda aufgezeigt. Die Resultate zeigten gegenüber den anderen zwei Kombinationspaaren, vor allem bei den niedrigen Konzentrationen, den von uns erwarteten synergistischen Effekt, d.h. die gemessenen Werte lagen oberhalb der rechnerisch ermittelten, so wurden beispielsweise bei einer Dosis von 0,01 µg/ml 2-Cda plus 0,25 µg/ml Ara-C 23,18 % gegenüber 21,39 % erreicht (Abbildung 4).

In den Abbildungen 5 (Ara-C plus Bendamustin) und 6 (Ara-C plus Fludarabin) sind die Resultate der sequentiellen Applikationen der Medikamentenpartner dokumentiert. Die Idee durch eine zeitlich verschobene Gabe der Zytostatika die synergistische Wirkung zu erzielen, konnte wie in den Abbildungen zu sehen, nicht erreicht werden. Auch hier lagen die gemessenen Zahlen weit unterhalb der zu erwartenden Werte, völlig unabhängig von Konzentration und Inkubationszeit. So wurde bei der Beimpfung der HEL Zellen mit 70 µg/ml Bendamustin und 1,75 µg/ml Ara-C statt der gedachten 47,45 % nur 30,73 % toter und apoptotischer Zellen bestimmt (Abbildung 5). Ein ähnliches Bild fand sich bei der Kombination von Ara-C mit Fludarabin (Abbildung 6). Zusammenfassend lässt sich sagen, daß nur durch eine simultane Inkubation der Zellen mit Ara-C und Cladribin eine synergistische Wirkung zu erreichen war.

Zwischen den beiden myeloischen Zelllinien ließen sich nur minimale quantitative Unterschiede feststellen. Die Ergebnisse waren jedoch identisch.

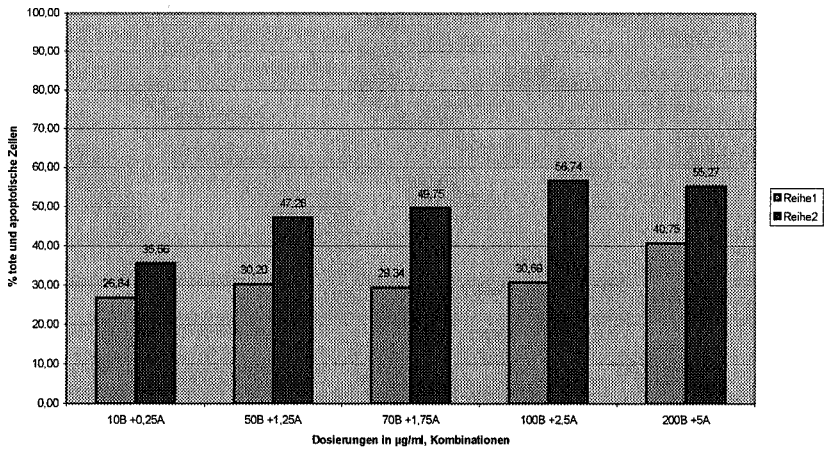


Abb. 3: Simultane Inkubation mit Bendamustin und Ara-C
Reihe 1: gemessenen Werte
Reihe 2: erwartete Werte
Zelllinie: HEL

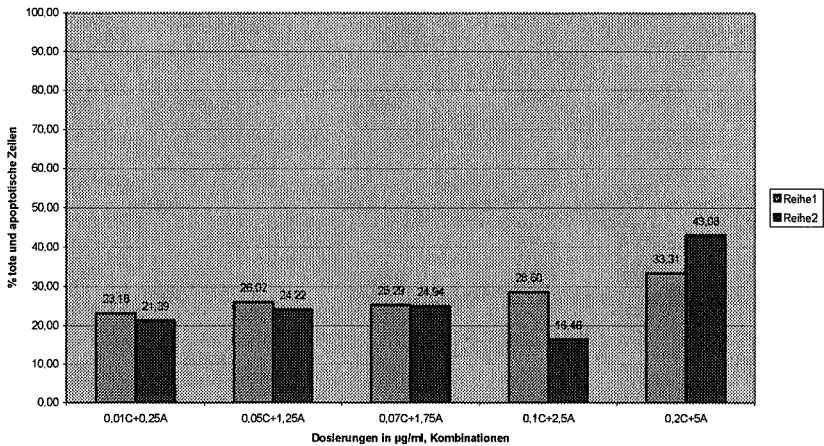


Abb. 4: Simultane Inkubation mit 2-CdA und Ara-C
Reihe 1: gemessene Werte
Reihe 2: erwartete Werte
Zelllinie: HL 60

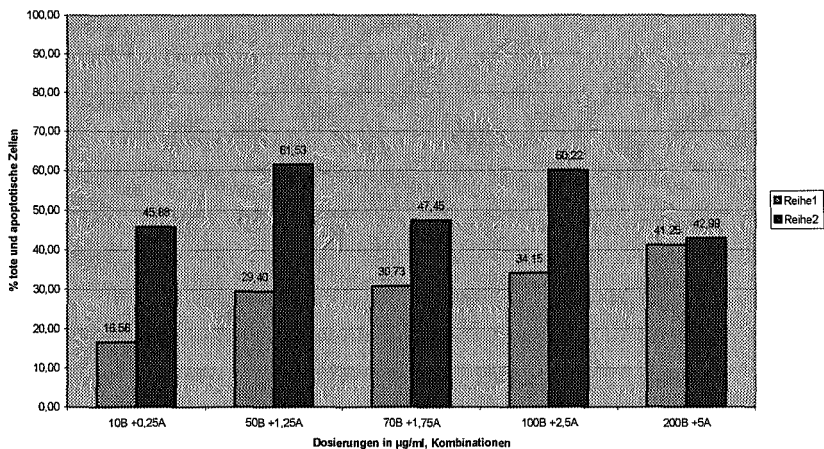


Abb. 5: Konsekutive Inkubation mit Bendamustin und Ara-C

Reihe 1: gemessene Werte

Reihe 2: erwartete Werte

Zelllinie: HEL

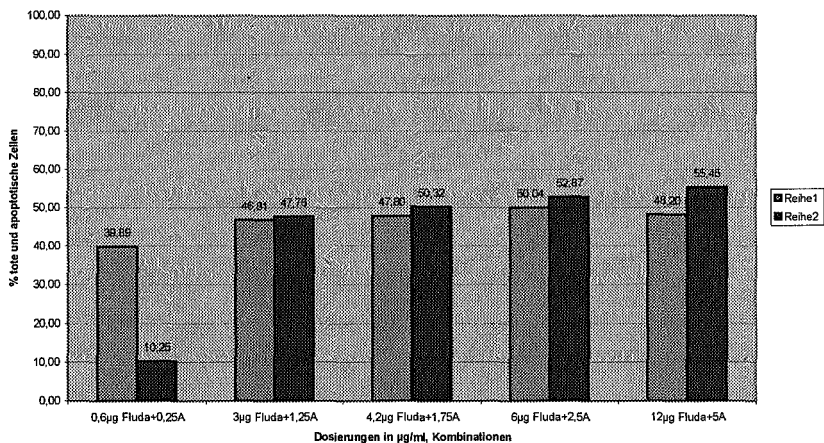


Abb. 6: Konsekutive Inkubation mit Fludarabin und Ara-C

Reihe 1: gemessene Werte

Reihe 2: erwartete Werte

Zelllinie: HEL

5.4. Bestätigung der Apoptosemessung am FACScan-Durchflußzytometer mit Annexin und Bestimmung des Zusammenbruchs des Mitochondrienmembranpotentials mit JC-1

Zur Reproduktion der oben beschriebenen Ergebnisse der einzelnen Experimente, wurden diese Versuche mit Annexin V wiederholt. Annexin V ist ein nicht-glykolisiertes Phosphoprotein, welches eine starke kalziumabhängige Bindung an Phospholipide besitzt. Dadurch ist es zur Untersuchung der Vorgänge an der Zellmembran während der Apoptose geeignet, da es beim Vorgang der Apoptose zur Störung der Asymmetrie der zellulären Lipidmembran kommt. Durch Gegenfärben mit Propidiumjodid (PI, ein wasserlöslicher DNS Farbstoff) können vitale, frühapoptotische und apoptotische Zellen voneinander unterschieden werden. Eine vitale Zelle lässt sich mit keiner der beiden Substanzen anfärben (Annexin und PI negativ). Während der Frühphase der Apoptose ist die Integrität der Zellmembran noch gegeben, so daß PI diese nicht passieren kann, die frühapoptotische Zelle lässt sich daher nur mit Annexin V und nicht mit PI anfärben (Annexin positiv, PI negativ). Eine apoptotische ebenso wie eine nekrotische Zelle sind im Gegensatz dazu Annexin V und PI positiv. Ein wichtiger Schritt im Ablauf der Apoptose ist der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials (MMP). JC-1 ist ein mitochondrialer Farbstoff, der in lebenden Zellen Mitochondrien in Abhängigkeit des Membranpotentials anfärbt. Bei hohem MMP (vitale Zellen) emittiert es eine rote Fluoreszenz, bei niedrigem MMP (apoptotische Zellen) eine grüne Fluoreszenz. Die Bestimmung der Apoptoserate und des Zusammenbruchs des mitochondrialen Membranpotentials erfolgten am FACscan (fluorescence-activated cell sorter) Durchflußzytometer.

In den Abbildungen 1 bis 6 sind die Resultate der Annexin-Messungen an den beiden myelischen Zelllinien HEL und HL 60 dargelegt. Die hier gewählte Darstellungsweise war die Combinations-index-Methode (CI), die es erlaubt eindeutig antagonistische von synergistischen Effekten zu unterscheiden. Verglichen wurden dabei die Werte der IC 50, IC 75 und IC90. Die Abkürzung IC steht für diejenige Dosis eines Medikamentes, die 50 %, 75 % bzw. 90 % der maximalen Wirkung auslöst (Induktion der Apoptoserate, Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, Hemmung der Zellproliferation). Liegt der Wert der CI über 1 ist von einer antagonistischen Wirkung auszugehen, umgekehrt bedeutet ein CI-Wert unter 1 einen synergistischen Effekt.

Entsprechend der bei den 7-AAD Versuchen gewonnenen Ergebnisse ließen sich die Wirkungen der Einzeldosen der Chemotherapeutika Ara-C, Bendamustin und Fludarabin nicht durch deren Kombinieren steigern (Abbildung 1,3,4 und 6). Ein synergistischer Effekt war nur

durch die Applikation von Cytarabin plus Cladribin zu erreichen (Abbildung 2 und 5). Dabei spielte es keine Rolle, ob die Inkubation der Zellen mit den Chemotherapeutika simultan oder sequentiell erfolgte. Eine Abhängigkeit bezüglich der Inkubationszeiten (24 h oder 48 h) bestand ebenfalls nicht.

In den Abbildungen 7 bis 12 sind die Resultate der JC-1-Messung dokumentiert. Auch hier wurde die Combinations-index-Methode verwendet. Die erzielten Ergebnisse stimmten mit den Resultaten der Apoptosemessungen überein. Die Kombinationen Cytarabin plus Bendamustin bzw. Fludarabin führten zu einer antagonistischen Wirkung ($CI > 1$). Die Kombination Cytarabin plus Cladribin ließen einen synergistischen Effekt erkennen ($CI < 1$), wie in Abbildung 8 und 11 zusehen ist. Die Ergebnisse waren ebenfalls unabhängig von den Inkubationszeiten und den Inkubationsschemata (simultan oder konsekutiv). Die Differenzen zwischen den beiden myeloischen Zelllinien waren minimal.

ANNEXIN V

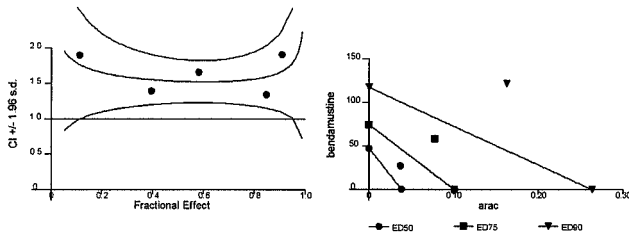


Abb. 1: Kombination von Bendamustin und Ara-C
Zelllinie: HEL
Ergebnis: antagonistische Wirkung

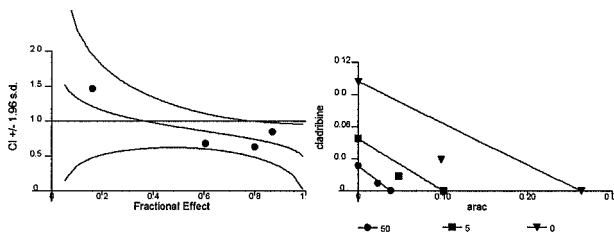


Abb. 2: Kombination von Cladribin mit Ara-C
Zelllinie: HEL
Ergebnis: synergistische Wirkung

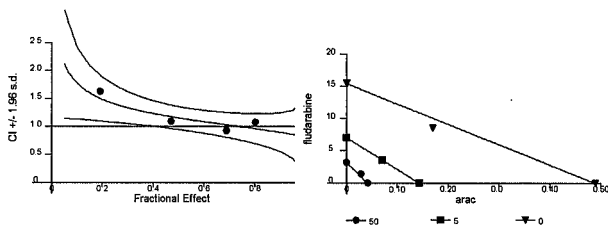


Abb. 3: Kombination von Fludarabin mit Ara-C
Zelllinie: HEL
Ergebnis: additive bis antagonistische Wirkung

ANNEXIN V

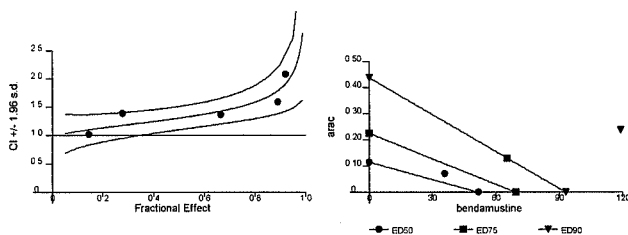


Abb. 4: Kombination von Bendamustin mit Ara-C
Zelllinie: HL 60
Ergebnis: additive bis antagonistische Wirkung

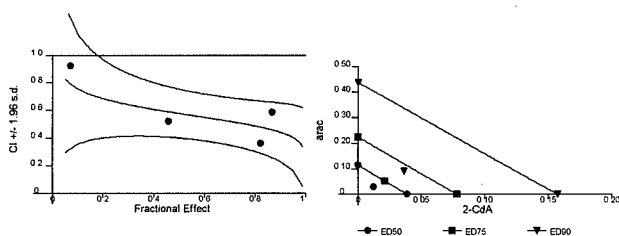


Abb. 5: Kombination von Cladribin mit Ara-C
Zelllinie: HL 60
Ergebnis: synergistische Wirkung

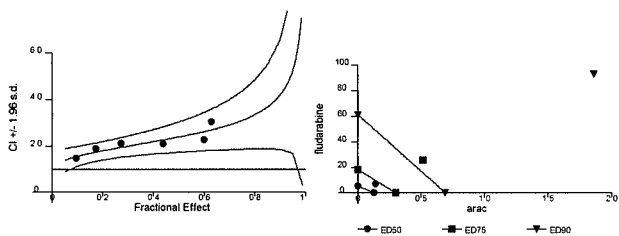


Abb. 6: Kombination von Fludarabin mit Ara-C
Zelllinie: HL 60
Ergebnis: additive bis antagonistische Wirkung

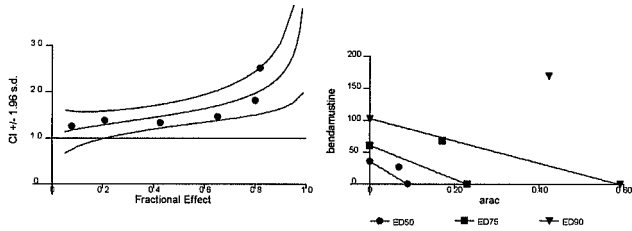


Abb. 7: Kombination von Bendamustin mit Ara-C
Zelllinie: HL 60
Ergebnis: antagonistische Wirkung

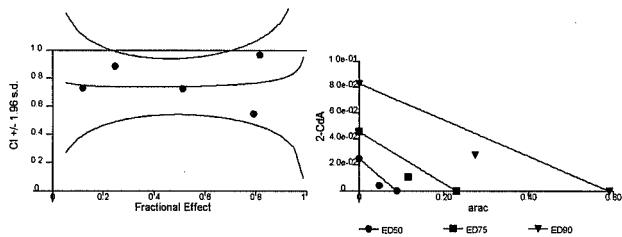


Abb. 8: Kombination von Cladribin mit Ara-C
Zelllinie: HL 60
Ergebnis: synergistische Wirkung

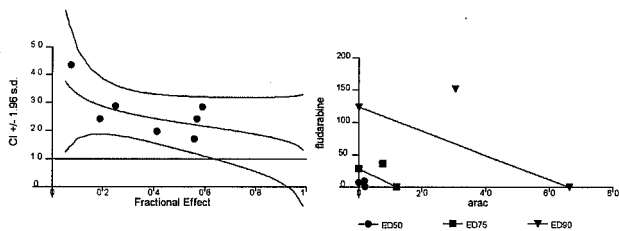


Abb. 9: Kombination von Fludarabin mit Ara-C
Zelllinie: HL 60
Ergebnis: additive bis antagonistische Wirkung

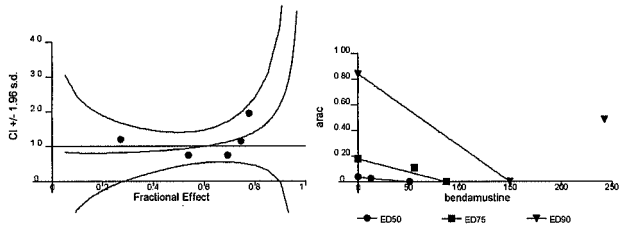


Abb. 10: Kombination von Bendamustin mit Ara-C
Zelllinie: HEL
Ergebnis: additive bis antagonistische Wirkung

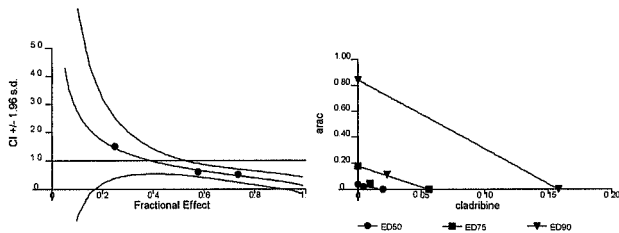


Abb. 11: Kombination von Cladribin mit Ara-C
Zelllinie: HEL
Ergebnis: synergistische Wirkung

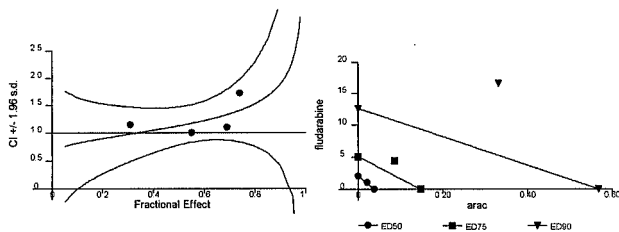


Abb. 12: Kombination von Fludarabin mit Ara-C
Zelllinie: HEL
Ergebnis: additive bis antagonistische Wirkung

5.5. Messung der Proliferationsrate mit dem MTT-Assay

Neben der Bestimmung der Apoptoserate wurde die Proliferationsfähigkeit der Zellen unter dem Einfluss der Chemotherapeutika untersucht. Zur Bestimmung der Proliferationsfähigkeit von Zellen eignen sich spezielle Proliferationsassays, die gewöhnlich die mitochondriale Aktivität messen. Sie basieren auf der Tatsache, daß Zellen unter dem Einfluss zytotoxischer Substanzen die Fähigkeit verlieren die benötigte Energie für die metabolische Zellfunktion und für das zelluläre Wachstum zu liefern und beizubehalten, es kommt zur Schädigung und zum Untergang der Zelle. Die untersuchten Zellen (HL 60 und HEL, myeloische Zelllinien) wurden dabei mit colorimetrischen Substraten, den Tetrazolium-Salzen inkubiert. Die gelben Tetrazolium-Salze werden von noch vitalen, teilungsfähigen Zellen zu einem wasserlöslichen Formazan-Salz reduziert. Dadurch ändert sich die Wellenlänge des entsprechenden Salzes. Die Änderungen der einzelnen Wellenlängen können mit Hilfe eines Elisareaders erfasst werden. Die Dokumentation der Resultate erfolgte unter Verwendung der Combinations-index-Methode. Die Ergebnisse sind in Abbildung 1 bis 6 dargestellt.

Erwartet wird eine Abnahme der Teilungsfähigkeit der HEL und HL60 Zellen entsprechend des Anstiegs der Apoptoserate. Dokumentiert ist die gleichzeitige Gabe der Medikamente Ara-C plus Fludarabin, Ara-C plus Bendamustin und Ara-C plus Cladribin.

Die Kurvenverläufe der Abbildungen 1,3,4 und 6 (Cytarabin kombiniert mit Bendamustin oder Fludarabin) stimmen mit den Verläufen der Abbildungen der Apoptosemessungen mit Annexin und JC-1 überein. Die Medikamentenkombinationen verursachten eine antagonistische Wirkung auf die Hemmung der Zellproliferation ($CI > 1$) in gleicher Weise wie sie zur Induktion der Apoptose führten. Im Gegensatz dazu wurde der hemmende Effekt auf die Proliferationsfähigkeit der Zellen durch die gleichzeitige Applikation der beiden Chemotherapeutika Ara-C plus Cladribin erhöht ($CI < 1$), wie in Abbildung 2 und 5 zu sehen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, daß die Abnahme der Teilungsfähigkeit der Zellen mit der Induktion des programmierten Zelltods korreliert. Auch hier ließ sich eine synergistische Wirkung nur durch die Kombination von Cytarabin mit Cladribin erzielen, unabhängig von den Inkubationszeiten und -schemata (konsekutiv und simultan).

MTT-ASSAY

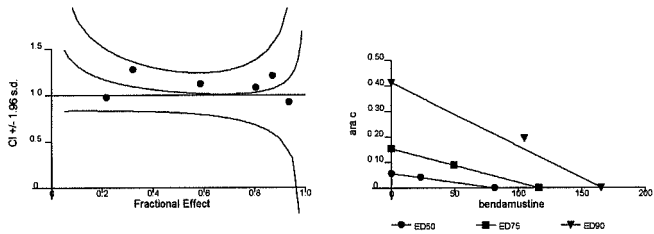


Abb. 1: Kombination von Bendamustin mit Ara-C
Zelllinie: HL 60
Ergebnis: additive bis antagonistische Wirkung

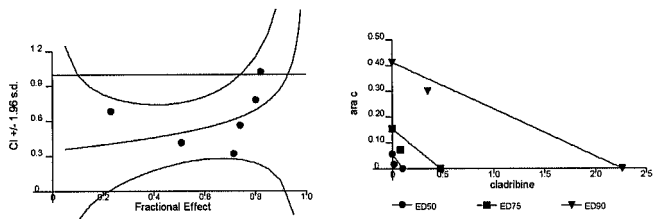


Abb. 2: Kombination von Cladribin mit Ara-C
Zelllinie: HL 60
Ergebnis: synergistische Wirkung

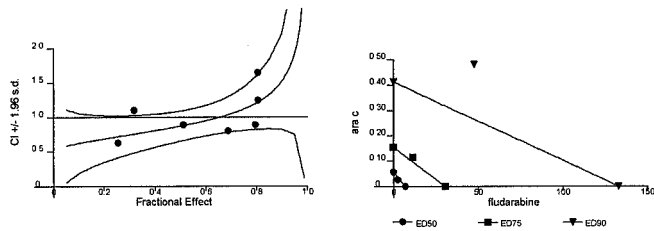


Abb. 3: Kombination von Fludarabin mit Ara-C
Zelllinie: HL 60
Ergebnis: synergistische bis antagonistische Wirkung

MTT-ASSAY

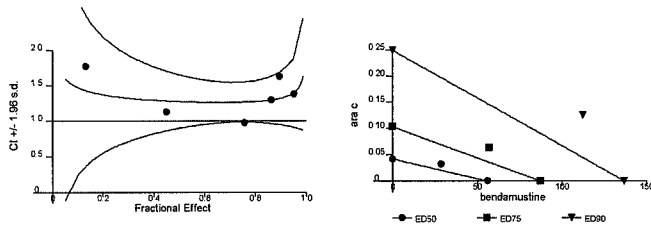


Abb. 4: Kombination von Bendamustin mit Ara-C
Zelllinie: HEL
Ergebnis: additive bis antagonistische Wirkung

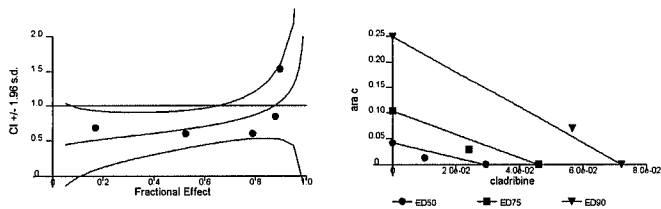


Abb. 5: Kombination von Cladribin mit Ara-C
Zelllinie: HEL
Ergebnis: synergistische Wirkung

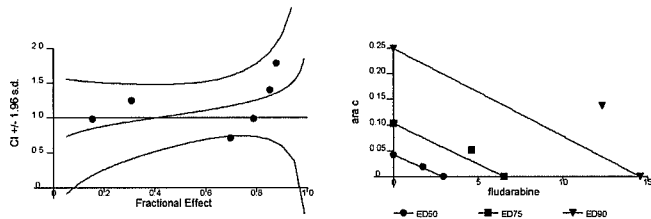


Abb. 6: Kombination von Fludarabin mit Ara-C
Zelllinie: HEL
Ergebnis: additive bis antagonistische Wirkung

5.6. Ergebnisse der Western Blots

Neben der Bestimmung der induzierten Apoptoserate und der Hemmung der Zellproliferation durch die obengenannten Medikamentenkombinationen, bestand ein großes Interesse die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der molekularen Mechanismen zu untersuchen. Analysiert wurden die verschiedenen Ebenen der Apoptoseregulationsmechanismen, an welchen apoptotische und proapoptotische Proteine beteiligt sind. Als Methode hierfür eignete sich der Western Blot, der die Quantifizierung, die Identifizierung und die Bestimmung des Molekulargewichtes bestimmter Proteine erlaubt. Zur Darstellung der apoptotischen und proapoptotischen Proteine wurden spezielle Antikörper eingesetzt, die mit spezifischen Antigenbindungsstellen der Zielproteine reagieren.

Zu den proapoptotischen Proteinen gehören zum einen die Mitglieder der Bcl-2 Familie, wie Bax, Bcl-Xs, Bad, Bid, Bik und Bak, sowie die Caspasen 2, 8, 9 und 10, antiapoptotisch sind die Mitglieder der Bcl-2 Familie, wie Bcl-2 und Bcl-XL. Apoptoseexekutoren (Effektorcaspasen) sind die Caspasen 3, 6, und 7.

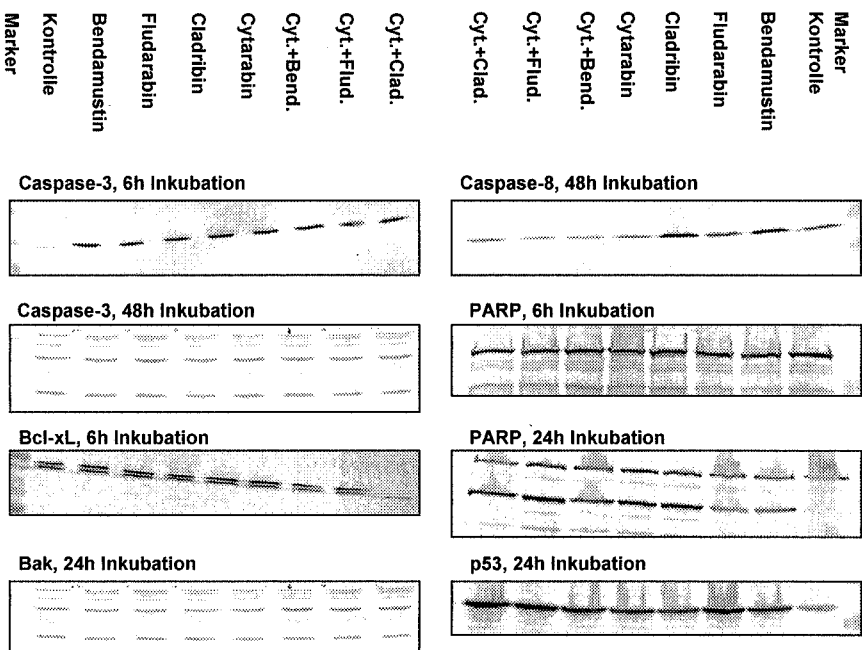
Bestimmt wurde die Expression der Proteine nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (nach 2 h, 6 h, 24 h und 48 h). Verwendet wurden die beiden myeloischen Zelllinien HEL und HL 60. Die gewählten Dosierungen waren diejenigen, die bei der Apoptosemessung 50 % der maximalen Wirkung auslösten (IC 50). Untersucht wurde zum einen der Einfluss auf die Expression der apoptoserelevanten Proteine durch die einzelnen Zytostatika Cladribin, Bendamustin, Cytarabin und Fludarabin appliziert als Einzelsubstanzen im Vergleich zu den Medikamentenkombinationen Cytarabin plus Fludarabin, Cytarabin plus Bendamustin und Cytarabin plus 2-CdA. Als Kontrolle diente die gleiche Menge an Zellsuspension ohne Zugabe von Zytostatika. In allen gezeigten Abbildungen befindet sich in der ersten Spalte der Marker für das Molekulargewicht, in der zweiten Spalte die Kontrolle, in den folgenden Spalten die Einzelgaben von Bendamustin, Fludarabin, Cladribin und Ara-C. In den letzten drei Spalten sind die Kombinationen aufgetragen.

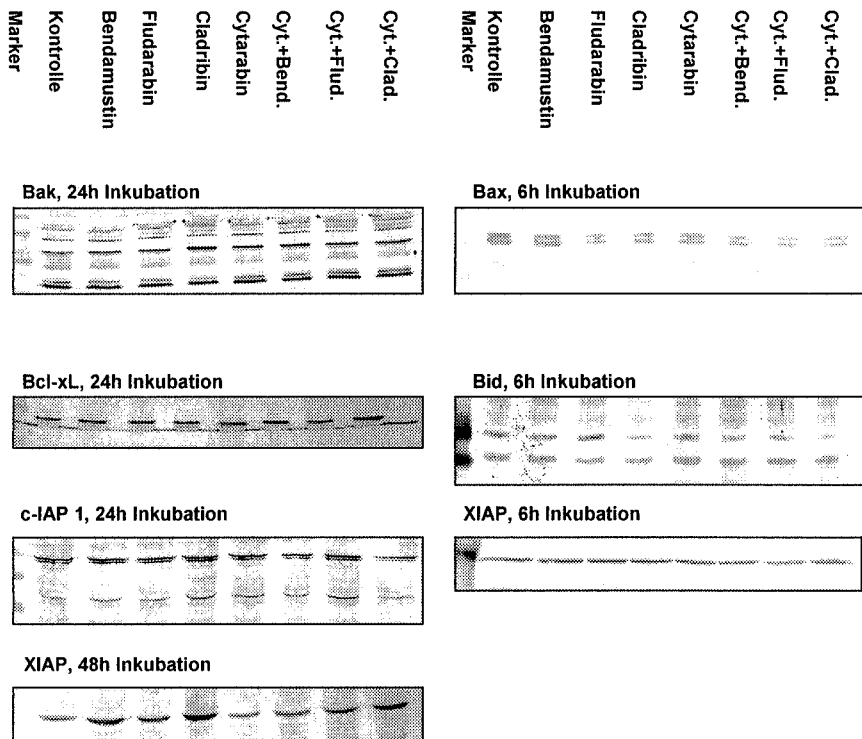
In Abbildung 1 sind die getesteten Proteine an der Zelllinie HEL aufgeführt und in Abbildung 2 an der Zelllinie HL 60. Dabei werden nicht alle Inkubationszeiten eines Experimentes gezeigt, da diese nur geringe Differenzen in den Expressionsmustern aufwiesen. In den durchgeführten Experimenten konnten weder die Einzelsubstanzen noch die Kombinationen eine Änderung der Expressionsspiegel der untersuchten pro- und antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie, der IAPs (inhibition of apoptosis proteins), der Caspasen oder des Par-4 bewirken. Die Resultate waren unabhängig von der Inkubationszeit.

Einzigste Ausnahme war das, erst nach erfolgter Spaltung aktive proapoptotische Protein PARP. An den Ausschnitten der Western Blots ist zusehen, daß die Spaltung des Proteins erst nach 24 stündiger Inkubation mit den Purin-und Pyrimidinanaloga erfolgte, das entstandene Spaltprodukt wurde als zweite Bande mit niedrigerem Molekulargewicht sichtbar. Da die Kontrolle frei von Zytostatika war, fehlte die zweite Bande, da keine PARP-Spaltung stattfand. Die Spaltung des proapoptotischen Proteins ist unabhängig vom entsprechenden Zytostatikum, ob einzeln oder als Kombination gegeben.

In Abbildung 2 bei den HI 60 Zellen und in Abbildung 1 bei den HEL Zellen erkennt man eine verminderte Expression der Proteine bei den Medikamentenkombinationen gegenüber den Einzelgaben der Chemotherapeutika bei den Caspasen 8 und 9 nach 48 h. Weitere Erkenntnisse im Zusammenhang mit den Apoptose- und Proliferationsversuchen ließen sich aus den eben beschriebenen Experimenten nicht schließen.

Abbildung 1: Expression der Apoptose regulierenden Proteine nach 2 h, 6 h, 24 h und 48 h Zelllinie: HEL





6. Diskussion

Purinanaloga und Pyrimidinanaloga sind essentielle Komponenten und sehr wirksame Substanzen in der Behandlung von lymphoproliferativen und hämatologischen Erkrankungen, wie z.B. der AML oder niedrigmaligner non-Hodgkin-Lymphome (z.B. CLL)^{65,6,9,37} Zur Erhöhung der klinischen Effektivität, sprich das Erreichen und den Erhalt kompletter Remissionen und zur Verringerung der Toxizitäten werden in vielen Standardregimes zur Behandlung hämatologischer maligner Erkrankungen Purin- und Pyrimidinanaloga miteinander kombiniert. Hauptwirkmechanismen der zytostatisch wirksamen Medikamente ist die Induktion der Apoptose¹ und die Hemmung der Zellproliferation. Beide Mechanismen führen am Ende zum Untergang der Zelle und damit zur Tumorregression.

6.1. Induktion des programmierten Zelltodes durch 2-CdA alleine oder in Kombination mit Gemcitabin

In verschiedenen klinischen Phase II Studien wurde die Wirksamkeit von 2-CdA (Purinanalogon) demonstriert.³⁸ In den meisten Studien wurde Cladribin als Einzelsubstanz verabreicht; Anwendung findet es bei der chronisch lymphatischen Leukämie, bei der Haarzelleukämie und bei niedrigmalignen Lymphomen.^{39,40} Es besitzt sowohl eine zytotoxische Aktivität gegenüber ruhenden als auch gegenüber proliferierenden Lymphozyten. In den von Chow et al³⁸ beschriebenen Ergebnissen, zeigte sich eine von der Dosierung abhängige Erhöhung der Apoptoserate durch Cladribin als Einzelsubstanz, die Messung der Apoptoserate erfolgte mittels der Durchflußzytometrie. Es stellte sich nun die Frage, ob sich der Metabolismus des 2-CdA in gleicher Weise verhält. Methode der Wahl zur Untersuchung des Metabolismus von Zytostatika war die Hochflüssigkeitschromatographie (HPLC), mit welcher man durch Bestimmung der AUC (Area under the curve) die intrazellulären Spiegel der 2-CdA Nukleotide (CdAMP, CdADP und CdATP) im Bezug auf die Steigerung der Dosis durch Integration quantifizieren konnte.³⁸ Verwendet wurde hier ein Ionenpaar HPLC- System, als mobile Phase der Puffer Triethylammoniumphosphat und eine C₁₈-Säule, die, wie auch von Reichelova et al⁴¹ gezeigt wurde, eine adäquate bzw. überlegene Separation der Nukleotide des 2-Chlorodeoxyadenosin erlaubte. Die gewählten Dosierungen des Zytostatikums waren äquivalent zu den physiologischen Konzentrationen die zur Behandlung von Patienten eingesetzt wurden, wie z.B. von Lawrence et al²⁰ beschrieben wurde. Zur Bestimmung der Pharmakoki-

netik wurden die Zellen über 1h, 3h, 5h und 8h mit der jeweiligen Dosis des Cladribins inkubiert. Wie die im Ergebnisteil beschriebenen Resultate zeigten, ließ sich durch die Steigerung der Dosis von Cladribin keine direkte proportionale Erhöhung der 2-CdA-Triphosphate erzielen. Dies wurde auch durch ex vivo Studien von Albertioni et al¹⁸ bestätigt; sie konnten keine klare Beziehung zwischen den Plasmaspiegeln von 2-CdA und der intrazellulären Konzentration der aktiven Metabolite herausfinden. Auch sie beobachteten, daß es keine Korrelation zwischen den zellulären CdAMP- und CdATP- Spiegeln in Patientenzellen gab.¹⁸ Zwei Gründe könnten dafür ursächlich gewesen sein, und zwar könnte zum einen die Kapazität des phosphorylierenden Enzyms Deoxycytidinkinase für CdATP geringer gewesen sein, zum anderen könnte ein schnellerer Abbau des CdATP vorgelegen haben.¹⁸ Es war daher anzunehmen, daß die intrazellulären Konzentrationen durch das Gleichgewicht dieser beiden Prozesse bestimmt wurde.¹⁸ Die Halbwertszeit schien damit der limitierende Faktor der intrazellulären CdATP Konzentration gewesen zu sein. Die fehlende Übereinstimmung zwischen der erzielten Apoptoserate und dem intrazellulären Metabolismus des Cladribins unterstützte die Beobachtungen von Avery et al⁴² und Begleiter et al⁴³, die Zelllinien unterschiedlichsten Ursprungs und Leukämiezellen von Patienten mit CLL untersuchten und dabei keine Beziehung zwischen den Nukleotiden des Cladribins und der Empfindlichkeit auf das Chemotherapeutikum finden konnten. So war anzunehmen, daß der apoptotische Effekt von 2-CdA vom Mechanismus der intrazellulären Aufnahme und der Aktivität der Deoxycytidinkinase (dCK), als limitierenden Faktor, abhängig war.³⁸ Albertioni et al¹⁸ erklärten damit auch die von ihnen bei verschiedenen Patienten beobachtete Variabilität der klinischen Wirkung.¹⁸ Die Aktivität der Deoxycytidinkinase korrelierte dabei mit der klinischen Antwort bei der Therapie der CLL, eine Korrelation zwischen der Menge des zellulären CdATP und der Plasmakonzentration von 2-CdA oder der dCK Aktivität ließ sich jedoch nicht nachweisen.¹⁸

Ein erheblicher apoptotischer Effekt konnte schon mit der am niedrigsten gewählten Cladribindosis erzielt werden, es stellte sich daher die Frage, ob es in klinischen Studien sinnvoll wäre diese zu erhöhen.³⁸ Diese Beobachtungen stimmten mit den klinischen Ergebnissen verschiedener Phase II Studien überein, die herausfanden, daß mit niedrigeren Dosen von Cladribin die gleiche antineoplastische Aktivität in der Behandlung niedrigmaligner Lymphome zu erzielen war, wie mit den Standarddosierungen.⁴⁴ Es wurde deshalb von Chow et al³⁸ untersucht, ob durch die Kombination niedriger Dosierungen des Purinanalogs 2-CdA mit anderen Agenzien, z.B. Pyrimidinanaloga, eine Steigerung des klinischen Effektes erreicht werden kann, oder ob eine Dosissteigerung des Zytostatikums appliziert als Einzelsubstanz zu einem größeren Effekt führt.³⁸ Auch Hoffman et al⁴⁰ kombinierten Cladribin mit anderen antine-

oplastischen Agenzien (Cisplatin, Daunorubicin, Chlorambucil, Paclitaxel und Etoposid) zur Erhöhung der Ansprechrate. Von den getesteten Medikamenten zeigte jedoch nur die Kombination von Cladribin mit Cisplatin eine signifikante Erhöhung der Zytotoxizität gegenüber den Wirkungen der einzelnen Komponenten.⁴⁰ Die Zellen wurden hierbei mit beiden Substanzen gleichzeitig inkubiert, die Untersuchung der Effekte einer sequentiellen Applikation erfolgte nicht.⁴⁰

Da in vielen Standardregimes zur Behandlung maligner hämatologischer Erkrankungen Purin- und Pyrimidinanaloga zusammen appliziert werden, z.B. zur Behandlung der AML (Fludarabin plus Ara-C)^{7,9,10,37}, wurde hier untersucht, ob durch Kombination des Purinanalogs 2-Chlorodeoxyadenosin mit einem Pyrimidinanalogon dessen Effektivität durch Beeinflussung des intrazellulären Metabolismus gesteigert werden kann.

Gemcitabin (2'-2'-difluorodeoxycytidine, dFdC) ist ein neues Pyrimidinanalogon, das vielversprechende Aktivitäten gegenüber myeloischen und lymphatischen leukämischen Zellen in verschiedenen in vitro Studien und klinischen Studien gezeigt hat.^{26,27,29} Dabei versprach es nicht nur gute Ergebnisse als Einzelsubstanz, sondern zeigte auch vielversprechende Wirkungen mit anderen antineoplastisch wirksamen Medikamenten, wie es bei in vitro Ergebnissen an verschiedenen Zelllinien solider Tumoren beobachtet wurde.⁴⁵ So zeigten Gandhi et al⁸, daß dFdC als Modulator auf den Metabolismus anderer Nukleoside wirkt, wenn diese durch die Deoxycytidinkinase phosphoryliert wurden. Chow et al³⁹ analysierten die Induktion der Apoptose in mononukleären Zellen von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) und mit akuter myeloischer Leukämie (AML), sie kombinierten dFdC mit anderen Medikamenten wie 2-CdA, Doxorubicin und Cytosinarabinosid; Zytostatika, die bisher effektiv in der Behandlung von Leukämien und Lymphomen eingesetzt wurden. Daneben untersuchten sie die Induktion der Apoptose durch dFdC in der Kombination mit 2-CdA in myeloischen (HEL, HL 60) und in lymphatischen (HUT 78, JURKAT) Zelllinien in vitro.³⁹ Sie fanden heraus, daß eine simultane Inkubation der Zellen mit Cladribin und Gemcitabin zu einer antagonistischen Wirkung auf die Apoptoserate der CLL Zellen und der lymphatischen und myeloischen Zelllinien führte, änderten sie jedoch die Inkubation in eine sequentielle, so kam es zu einem synergistischen Effekt. Da Purinanaloga, wie 2-CdA und Fludarabin den intrazellulären Metabolismus anderer Pyrimidinanaloga (z.B. Ara-C) verstärken^{6,9}, wurde hier der Einfluss des neuen Pyrimidinanalogs Gemcitabin auf den intrazellulären Metabolismus des Cladribins mit der Hochflüssigkeitschromatographie an den zwei myeloischen Zelllinien HEL und HL 60 und an den zwei lymphatischen Zelllinien JURKAT und HUT 78 analysiert. Bei den durchgeführten Experimenten wurden zwei unterschiedliche Inkubationsschemata

untersucht, die Zellen wurden entweder gleichzeitig oder sequentiell mit beiden Agenzien beimpft, dabei wurde die Menge der exprimierten aktiven Metabolite des 2-CdA (2-CdAMP, 2-CdADP und 2-CdATP) und der zeitliche Verlauf bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte durch Berechnung der AUC (Area under the curve). Die Ergebnisse zeigten klar die Effektivität der Kombination dFdC mit 2-CdA in Abhängigkeit von den Inkubationsschemata in allen getesteten Zelllinien. Wurden dFdC und 2-CdA gleichzeitig appliziert, konnten keine aktiven Metabolite des Cladribins gemessen werden. Im Gegensatz dazu betrug nach konsekutiver Verabreichung der beiden Substanzen (Gemcitabin vor 2-CdA) der Spiegel des 2-CdA-5'-triphosphates mehr als 100 % der Kontrolle (2-CdA gegeben als Einzelsubstanz). Zur selben Zeit untersuchten Santini et al⁵ den Einfluss von dFdC auf die Aufnahme und den intrazellulären Metabolismus von Cytosinarabinosid (Ara-C) in HL 60 Zellen. Im Gegensatz zur gleichzeitigen Inkubation der Zytostatika fanden sie eine signifikante Erhöhung der Aufnahme von Cytosinarabinosid bei sequentieller Gabe von dFdC vor Cytarabin.⁵ Die Interaktionen zwischen dem Purin- und Pyrimidinanalogon waren somit abhängig von den Inkubationsschemata.³⁹ Zusammenfassend lässt sich sagen, daß der antagonistische Effekt auf die Apoptoserate durch die gleichzeitige Gabe der beiden Zytostatika durch die Änderung auf eine konsekutive Applikationsweise reduziert wurde, daneben wurden aber auch synergistische Effekte erzielt. Diese Daten sind vereinbar mit dem murinen Leukämie-Modell, das von Maranda et al⁴⁶ publiziert wurde. Es zeigte, daß die Applikation von dFdC vor 2-CdA die Überlebenszeit von mice bearing L1210 und p388 Leukämien verbesserte, im Vergleich zum Kontrollarm, bei welchem die beiden Medikamente entweder gleichzeitig verabreicht wurden oder zuerst mit 2-CdA vorbehandelt wurde. Im Gegensatz dazu zeigten die Autoren keine effektiveren Überlebenszeiten der Mäuse, wenn diese zuerst mit 2-CdA und dann mit dFdC oder alleine mit dFdC behandelt wurden.⁴⁶ Die Gründe für die antagonistischen Wirkungen der Kombination bei simultaner Gabe sind noch nicht vollständig geklärt. Man weiß, daß beide Chemotherapeutika durch die Deoxycytidinkinase metabolisiert werden. Ein überladenes Enzymsystem durch gleichzeitige Inkubationen, welches sich nach konsekutiver Applikation regeneriert, könnte dafür eine Erklärung sein. Diese Hypothese wird unterstützt durch in vitro Modelle, die beobachtet haben, daß die Kreuzresistenzen zwischen Gemcitabin und Cladribin mit der Aktivität der verschiedenen intrazellulären Enzyme, wie z.B. der Deoxycytidinkinase oder der 5'-Nukleotidase in myeloischen Zelllinien (HL 60), zusammenhängt.^{47,48} Für die Zukunft stellt sich nun die Frage, ob diese in vitro geschaffenen Inkubationsverhältnisse wie z.B. sequentielle Inkubationsschemata in vivo reproduzierbar sind.

6.2. Induktion der Apoptose durch Ara-C alleine und in Kombination mit verschiedenen Purinanaloga

Purinanaloga, wie Fludarabin und 2-CdA, haben bisher eine hohe Effektivität als Einzelsubstanzen z.B. in der Behandlung von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie gezeigt, aber auch in Kombination versprechen sie eine hohe Wirksamkeit.⁴⁹ Das Ziel war daher durch die Kombination etablierter Substanzen mit neuen Medikamenten additive und synergistische Effekte zu erzielen, resultierend in einer Steigerung der klinischen Effektivität, sprich das Erreichen und den Erhalt kompletter Remissionen und gleichzeitige Reduktion der Toxizität. Ara-C wurde bisher eingesetzt zur Remissionseinleitung, Konsolidierung und zur Erhaltungstherapie akuter lymphatischer und myeloischer Leukämien, ebenso bei der Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen vom intermediärem und hohem Malignitätsgrad u.a. Leukämieformen. Entscheidend für die klinische Effektivität des Medikamentes ist eine anhaltende hohe intrazelluläre Konzentration seines aktiven Metaboliten Ara-CTP, welcher letztendlich bei der Induktion des programmierten Zelltodes eine entscheidende Rolle spielt. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, daß die Medikamente 2-CdA, Fludarabin⁶⁻¹⁰ und Bendamustin modulierende Effekte auf den Ara-C Metabolismus ausüben, wenn man sie vor der Gabe des Cytarabins appliziert.⁶² So konnte beispielsweise beobachtet werden, daß die Dauer der erreichten kompletten Remissionen durch die Kombination von Ara-C mit Fludarabin im Vergleich zur Einzelgabe des Ara-C signifikant verlängert werden konnte⁴⁹, da Fludarabin den intrazellulären Metabolismus des Ara-C in seine aktiven Metabolite (Ara-CTP) in myeloischen und lymphatischen Zellen in vivo erhöht.⁵⁰ Die erhöhte Akkumulation von Ara-CTP ist wiederum assoziiert mit einer erhöhten Inkorporation von Ara-CMP in die DNS, was den Haupteffekt der Zytotoxizität ausmacht.⁵⁰

Der hier aufgezeigte Unterschied der antagonistischen und synergistischen Wirkung zwischen simultaner und sequentieller Applikation der beiden Medikamente, legte die Überlegung nahe, ob sich die Effektivität bekannter Standardregimes ebenfalls durch eine sequentielle Gabe erhöhen lässt. Gandhi et al haben in mehreren Studien die mittlerweile als Standardtherapie bei akuten myeloischen Leukämien⁷, und bei CLLs³⁷ eingesetzte Kombination aus Ara-C und Fludarabin hinsichtlich des Metabolismus ausreichend untersucht. Vermutet wurde, daß durch die Vorbehandlung mit Fludarabin, die Akkumulation von Ara-CTP in Leukämiezellen durch direkte biochemische Modulation der Deoxycytidinkinase und des Ara-C Metabolismus erhöht wurde^{7,51} und indirekt durch die Reduktion der dCTP Konzentrationen, welche als „Feedbackhemmer“ auf die Deoxycytidinkinase-Aktivität wirkten.⁵² Auch Russo et al⁵³ beo-

bachteten, daß die Therapiekombination von Ara-C mit Fludarabin und Idarubicin zu einer hohen Rate an kompletten Remissionen mit geringer Toxizität bei AML Patienten führte. Bisher wurde jedoch hauptsächlich der Metabolismus dieser Therapieschemata untersucht, das Ziel dieser Arbeit bestand nun darin den Einfluss auf die Induktion der Apoptose und auf die Expression apoptoserelevanter Proteine zu analysieren. Da bisher noch nicht gezeigt wurde, daß der gesteigerte Mechanismus des Ara-C durch die Kombination mit den Purinanaloga in einer synergistischen Wirkung auf die Induktion der Apoptose oder auf die Hemmung der Zellproliferation resultiert.⁶³

Gandhi et al⁶ demonstrierten, daß 2-Chlorodeoxyadenosin ein potenterer Hemmer der Ribonukleotidreduktase ist als Fludarabin. Außerdem konnte in vitro beobachtet werden, daß eine Inkubation von AML Blasten mit 2-CdA gefolgt von Ara-C durch biochemische Modulation, im Vergleich zur Einzelgabe von Ara-C, zu einer höheren Akkumulationsrate von Ara-CTP führt.⁶ Die Verabreichung von Ara-C mit 2-CdA resultiert in einer maximalen Hemmung der DNS Synthese, durch die erhöhte Akkumulation von Ara-CTP, dem größeren Verhältnis zwischen analogen Triphosphaten und normalen dNTPs, die Störung der dNTP Pools und die hintereinander geschaltete Inkorporation von CdATP und Ara-CTP in die wachsende DNS Kette.⁶ Auch Robak et al⁴ beobachteten in ihrer Studie, daß die Kombination aus Ara-C und 2-CdA eine effektive und gut tolerierbare Therapie in der Behandlung von AML-Patienten mit schlechter Prognose darstellt, die Effektivität ist dabei vergleichbar mit der Kombination aus Ara-C und Fludarabin.

Bendamustin ist eine neue zytostatische Substanz, die bisher Aktivitäten in der Behandlung von Non-Hodgkin Lymphomen und von B-CLLs bewies.⁵⁴ Bendamustin ist ein Chemotherapeutikum, daß durch seine chemische Struktur zur Gruppe der bifunktionellen alkylierenden Substanzen gehört, es vereint sowohl die Eigenschaften eines Purinanalogons als auch die Merkmale eines Alkylanz⁵⁴ und zur Therapie maligner hämatologischer Erkrankungen immer mehr in den Vordergrund rückt.

Der Nachweis und die Quantifizierung der apoptotischen Zellen erfolgte mittels der Durchflußzytometrie am FACScan durch Markierung mit der fluoreszierenden an die DNS bindenden Substanz 7-AAD. Da es im Ablauf des programmierten Zelltodes auch zum Zusammenbruch des Membranpotentials der Mitochondrien kommt, wurde auch diese am Durchflußzytometer mit dem mitochondrialen Farbstoff JC-1 geprüft. Die Bestimmung der Zellproliferation erfolgte mit Proliferationsassays (MTT) unter Verwendung spezieller Tetrazoliumsalze.

Die ermittelten Ergebnisse der Medikamentenkombinationen Ara-C mit Bendamustin bzw. Fludarabin zeigten einen additiven bis antagonistischen Effekt, im Gegensatz dazu führte die

gleichzeitige Gabe von Ara-C und 2-CdA zu einem synergistischen Effekt bezüglich der Inhibition der Zellproliferation, der Apoptoseinduktion und des Zusammenbruchs des mitochondrialen Membranpotentials. Auch Kristensen et al²² untersuchten verschiedene Substanzen in Kombination mit 2-CdA, dabei erzielten sie das beste Ergebnis der additiven Modelle mit Ara-C und 2-CdA, dies schien nicht überraschend, da die Phosphorylierung der beiden Substanzen zu ihren Monophosphaten in Leukämiezellen durch das selbe Schlüsselenzym erfolgt. Im Vergleich zu den anderen getesteten Medikamenten beobachteten sie unerwarteter Weise auch eine hohe Frequenz an synergistischen Interaktionen.²² Der genaue Wirkmechanismus dafür ist noch unklar, aber jüngste Beobachtungen haben gezeigt, daß Ara-C den zytotoxischen Effekt anderer Substrate steigern kann, da es die Sensibilität für die Deoxycytidinkinase erhöht, so kommt es bei der gemeinsamen Applikation mit dem Nukleosid Fludarabin zu einer Erhöhung der aktiven Metabolite, was als mögliche Erklärung gedeutet werden kann. Gandhi et al⁶ beobachteten, daß während der Therapie mit 2-CdA und Ara-C, die metabolischen und mechanischen Interaktionen die Synthese der DNS beeinflussen und dadurch auch die Zytotoxizität, es kommt zur maximalen Hemmung der DNS-Synthese. Erklärt wurde dies, wie oben schon angeführt, durch eine höhere intrazelluläre Akkumulation des Ara-CTP, einer größeren Ratio der analogen Triphosphate gegenüber den normalen dNTPs, einer Störung der dNTP Pools und durch eine nachgeschaltete Inkorporation von CdATP und Ara-CTP in die wachsende DNS Kette.⁶ Wie schon erwähnt untersuchten Gandhi et al⁹ den Metabolismus von Ara-C nach Vorbehandlung mit Fludarabin in myeloischen und lymphatischen Leukämiezellen, dabei zeigte sich eine Erhöhung des Effektes auf den Ara-C Metabolismus, was eine höhere klinische Effektivität versprach. Fludarabin wirkt wie Cladribin auf ruhende und sich teilende Zellen. Es fand bisher Anwendung in der Behandlung von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie vom B-Zell-Typ und von Patienten, die auf eine Behandlung mit einem oder mehreren alkylierenden Substanzen (Standard Therapieschemata) nicht angesprochen haben, d.h. Patienten die therapierefraktär waren.⁹ Diese Steigerung der Ara-CTP Akkumulation durch intrazelluläres Fludarabin ist vermutlich auf einen unabhängigen Effekt des Fludarabins auf die Deoxycytidinkinase zurückzuführen, es kommt zur Reduktion der Deoxynukleotidpools, welcher zum einen die Enzyme reguliert, zum anderen einen möglichen direkten Effekt auf die Aktivität der Deoxycytidinkinase ausübt und damit die Ara-C Phosphorylierung direkt stimuliert.⁹ Sie demonstrierten, daß die Rate des akkumulierten Ara-C höher war, nachdem die Zellen mit Fludarabin behandelt wurden.⁹ Im Gegensatz dazu führte eine Vorbehandlung mit Ara-C oder die gleichzeitige Applikation mit Fludarabin nicht zu einer synergistischen Wirkung auf den Metabolismus von Ara-C.⁹ Anders verhielt es sich,

wenn die Zellen mit Ara-CTP beladen waren und anschließend mit Fludarabin inkubiert wurden, dies führte nämlich zu einer Minderung der F-ara-ATP Akkumulation, dies war wahrscheinlich durch die Hemmung der Deoxycytidinkinase durch das Ara-CTP erklärbar.¹⁰ Nach Fludarabin Gabe ließ sich keine Erniedrigung der Ara-C Elimination beobachten, was implizierte, daß Fludarabin keine Wirkung auf den Katabolismus des Kombinationspartners hatte. Auch Galmarini et al¹ erklärten die Erhöhung der Ara-CTP Akkumulation durch die vorherige Gabe von Fludarabin durch eine erhöhte Rate des Anabolismus und durch eine verringerte Rate des Katabolismus von Ara-CTP, vermutlich auch durch Steigerung der Inkorporation in die zelluläre DNS. Kano et al⁵⁵ demonstrierten additive und synergistische Effekte auf die Hemmung der Zellproliferation lymphatischer leukämischer Zelllinien, bei gleichzeitiger Verabreichung von Ara-C und Fludarabin. Tosi et al⁵⁶ beobachteten einen additiven zytotoxischen Effekt von Ara-C in Kombination mit Fludarabin auf ex vivo AML Zellen, nachweislich durch die Isobologramm-Analyse. In der selben Studie wurde der nach kurzen Inkubationszeiten beobachtete gesteigerter zytotoxische Effekt in Verbindung gebracht mit einer Steigerung der Ara-C Inkorporation in die DNS, wenn die beiden Zytostatika Ara-C und Fludarabin zusätzlich mit G-CSF kombiniert wurden, nach 48 h zeigte sich dann eine Abnahme der Ara-C Inkorporation in die DNS in den Fludarabin haltigen Proben.⁵⁶ Die Autoren stellten die Hypothese auf, daß eine prolongierte Aussetzung des Fludarabins die DNS-Ketten Elongation blockieren könnte und dadurch die Inkorporation in die DNS fördere.⁵⁶ Eine andere Erklärung könnte die Erschöpfung des intrazellulären Deoxycytidinkinase Pools sein, die von den Enzymen nach längeren Inkubationszeiten mit den Medikamenten benötigt wurden. Santini et al⁵ untersuchten sowohl die Kombination der beiden Substanzen Ara-C und Fludarabin, sowie Ara-C und Gemcitabin, sie beobachteten, daß beide Partner des Cytarabins die Eigenschaft besaßen, die intrazelluläre Konzentration von Ara-C und dessen zytotoxische Aktivität zu erhöhen.

Eine Vielzahl an Studien untersuchten die in vitro Aktivität von Ara-C mit 2-CdA und zeigten ähnliche Ergebnisse. Kornblau et al²³ demonstrierten in ihren in vitro und ex vivo Experimenten, daß eine Vorbehandlung mit 2-CdA zu einer erhöhten Akkumulation von Ara-CTP in zirkulierenden leukämischen Blasten führte. Klinisch ließ sich für die Kombination Cladribin plus Ara-C jedoch nur eine durchschnittliche Effektivität auf das Erreichen von Remissionen nachweisen.²³ Im Vergleich zu Fludarabin schien Cladribin effektiver zu sein, wenn es mit Ara-C kombiniert wurde.²³ Gandhi et al⁹ beobachteten eine erhöhte Aufnahme von Ara-C nach Präinkubation mit 2-CdA in ex vivo Zellen. In einer Phase I Studie demonstrierten Kornblau et al²³, daß dieses Regime keine Verbesserung bei der Behandlung von rezidiv-

renden bzw. refraktären AMLs bewirkten. Diese Studien zeigten weitere in vitro Effekte, die durch die Kombination von Ara-C mit Purinanaloga verursacht wurden. Die beobachteten zytotoxischen Effekte waren zum einen abhängig vom Ursprung der Zelle und zum anderen von der Inkubationszeit der Medikamente.²³ Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigten keine Abhängigkeit der Effekte von den Inkubationsschemata (simultane oder sequentielle Applikation) und vom Ursprung der Zellen (HL 60 oder HEL), was andeutete, daß zusätzliche Mechanismen involviert gewesen sein könnten, die an den verschiedenen Effekten von Fludarabin oder 2-CdA beteiligt waren. Galmarini et al¹ fanden heraus, daß die gleichzeitige Darreichung von Ara-C und 2-CdA zu folgenden Resultaten führten: eine maximale Hemmung der DNS-Synthese, eine hohe Konzentration des Ara-CTPs, ein hohes Verhältnis der analogen Triphosphate gegenüber den normalen dNTPs und ein aufeinanderfolgender Einbau des 2-CdATP und des Ara-CTP in die wachsende DNS-Kette. Es konnte gezeigt werden, daß die in vitro Effektivität der Medikamentenkombinationen, die Ara-C und Purinanaloga enthalten abhängig waren vom Typ des Purinanalogs, welches appliziert wurde, unabhängig vom Inkubationsschemata oder von der Dosis des jeweiligen Zytostatikums.¹

Bendamustin, ein neues Chemotherapeutikum mit den Eigenschaften eines Alkylanz und eines Purinanalogs, wurde ebenfalls mit Cytarabin kombiniert. Aufgrund seiner chemischen Struktur war anzunehmen, daß dadurch ein möglicher synergistischer Effekt auf die Apoptose und auf die Zellproliferation zu erzielen war. Beobachtet wurde jedoch eine antagonistische Wirkung, sie war sogar höher als bei der gleichzeitigen Gabe von Ara-C und Fludarabin. Als Einzelsubstanz verabreicht ließ sich in vitro eine hohe Effektivität auf neoplastische Lymphozyten nachweisen. Staib et al⁶⁰ untersuchten den Einfluss von Gemcitabin, Bendamustin, Fludarabin und 2-CdA auf den Metabolismus des Cytarabins an AML-Zellen ex vivo, dabei konnte kein genereller Nutzen auf die Ara-CTP Produktion durch die Präinkubation obengenannter Medikamente beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, daß allein durch die Kombination von Ara-C mit 2-CdA ein additiver bis synergistischer Effekt auf die Apoptoserate und auf die Proliferationsrate zu erzielen war, dabei spielte es keine Rolle, ob die Chemotherapeutika gleichzeitig oder sequentiell verabreicht wurden.

6.3. Einfluss der Medikamentenkombinationen auf die Expression apoptoserelevanter Proteine

Nach der Untersuchung des Einflusses der unterschiedlichen Medikamentenkombinationen auf die Apoptoserate und die Zellproliferation, stellte sich die Frage, wie sich die oben beschriebenen antagonistischen (Ara-C plus Fludarabin oder Bendamustin) und synergistischen (Ara-C plus 2-CdA) Effekte auf die Expression apoptoserelevanter Proteine auswirken.

Bisher wurden zwei verschiedene apoptotische Wege beschrieben. Der erste Weg wird durch sogenannte Todesrezeptoren, Mitglieder der Tumor Nekrose Faktor Familie, getriggert. Nach Aktivierung der Todesrezeptoren wird die Procaspase 8 gespalten, danach folgt die Induktion der Effektorcaspasen. Durch die Spaltung von Bid ist die Caspase 8 in der Lage den zweiten Weg zu aktivieren, und zwar den mitochondrialen Weg, welcher am Ende zur Aktivierung der Exekutionscaspasen führt und die PARP-Spaltung verursacht. Der mitochondriale Weg wird durch die Bcl2 Familie reguliert, einige der Familienmitglieder sind in den Mitochondrien lokalisiert, entweder fördern (Bax, Bak, Bad, Bid) oder hemmen (Bcl2, Bcl-XL) sie die Apoptose. Aufgrund der synergistischen und antagonistischen Effekte der Medikamentenkombinationen auf den Zusammenbruch des Mitochondrienmembranpotentials, könnte eine Beteiligung dieser Proteinfamilie an den erzielten Resultaten vermutet werden. Verglich man die durch die Applikation der Einzelsubstanzen verursachten Expressionsraten der pro- und anti-apoptotischen Bcl-2 Familienmitglieder, des proapoptotischen Par-4, des PARP, der Caspasen 3, 8 und 9, der IAPs und des p53 mit den erreichten Raten der Medikamentenkombinationen, ließ sich kein Unterschied in den erhaltenen Expressionsmustern durch die verschiedenen Zytostatikakombinationen erkennen. Die gewählten Dosierungen der Chemotherapeutika waren diejenigen, die bei der Apoptosemessung 50 % der maximalen Wirkung auslösten (IC 50). Bestimmt wurde die Expression der Proteine nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (2 h, 6 h, 24 h und 48 h) an den beiden myeloischen Zelllinien HEL und HL60. In vorhergehenden Studien wurde eine simultane Downregulation von XIAP und CIAP-1 beobachtet, anschließend kam es zur Steigerung der Aktivität der Exekutionscaspasen. Dies könnte als Mechanismus für den synergistischen Effekt der Kombination Cladribin plus Bendamustin gedeutet werden. Die Mechanismen der synergistischen und antagonistischen Effekte bleiben unklar. Daher ist anzunehmen, daß die Regulationsproteine auf der Stufe des Zellzyklus oder der DNS Kontrolle involviert sein könnten, da sich die obenbeschriebenen Effekte in den durchgeführten Zellproliferationsassays reproduzieren ließen. Zusammenfassend lässt sich sagen, daß die Medikamentenkombinationen (Ara-C plus Purinanaloga) durch ihre unterschiedlichen

Strukturen entweder synergistischen oder antagonistische Effekte bewirken. Da die Kombination von Ara-C mit 2-CdA effektiver erscheint als Ara-C kombiniert mit Fludarabin oder Bendamustin, sollte dies in klinischen Studien evaluiert werden.

7. Zusammenfassung:

Die Purinanaloga Cladribin und Fludarabin sowie die Pyrimidinanaloga Cytarabin und Gemcitabin sind wichtige Bestandteile in der Behandlung lymphoproliferativer und hämatologischer Erkrankungen. Die zwei Hauptmechanismen der zytostatisch wirksamen Medikamente sind zum einen die Induktion der Apoptose und zum anderen die Hemmung der Zellproliferation. Beide Wege führen am Ende zum Untergang der Zelle und damit zur Tumorregression. In verschiedenen klinischen Studien wurde die klinische Wirksamkeit der Nukleosidanaloga demonstriert. Das Ziel der Kombinationen etablierter Substanzen mit neuen Medikamenten ist der Erhalt additiver und synergistischer Effekte, resultierend in einer Erhöhung der klinischen Effektivität.

2-CdA, ein Purinanalogen, zeigte bisher Aktivitäten als Einzelsubstanz in der Behandlung niedrigmaligner Lymphome. Chow et al.³⁸ untersuchten die Induktion der Apoptose durch die Einzelgabe von 2-CdA und durch 2-CdA in Kombination mit anderen antineoplastischen Medikamenten. Die Messungen der Apoptoserate (Durchflußzytometrie) induziert durch die alleinige Gabe von Cladribin, ergab eine von der Dosis abhängigen Kurvenverlauf.³⁸ Mit Steigerung der Dosis erhöhte sich die Apoptoserate in den normalen wie in den neoplastischen Zellen. Hier wurde nun untersucht, ob sich durch die Steigerung der extrazellulären 2-CdA Konzentration, dessen intrazellulären Metabolismus erhöhen lässt und damit die Menge des aktiven Metaboliten 2-CdATP. Als Methode eignete sich hierfür die HPLC. Die Ergebnisse zeigten, daß mit zunehmender extrazellulärer Konzentration die intrazelluläre Phosphorylierung des Cladribins in seine aktiven Metabolite signifikant anstieg. Es ist daher anzunehmen, daß höhere Dosen in vivo in der Behandlung niedrigmaligner Lymphome in einer größeren klinischen Effektivität resultieren könnte.

Die klinische Effektivität könnte auch durch die Kombination mit anderen neoplastischen Substanzen erhöht werden. Untersucht wurde daher die Kombination von 2-CdA mit dem neuen Pyrimidinanalogen Gemcitabin (dFdC), welches bisher vielversprechende Aktivitäten gegenüber myeloischen und lymphatischen leukämischen Zellen gezeigt hat. Es wirkt dabei als Modulator auf den Metabolismus anderer Nukleoside, wenn diese durch die Deoxycytidinkinase phosphoryliert werden. Analysiert wurden unterschiedliche Inkubationsbedingungen (simultane und sequentielle Inkubation) an zwei myeloischen (Hel, HL 60) und an zwei lymphatischen (JURKAT, HUT 78) Zelllinien. Der Einfluss von dFdC auf den intrazellulären Metabolismus des 2-CdA wurde mit Hilfe der HPLC untersucht. Es wurde beobachtet, daß eine simultane Applikation beider Substanzen zu einer antagonistischen Wirkung führte, wäh-

rend eine konsekutive Gabe einen synergistischen Effekt bewirkte, unabhängig von der Inkubationsdauer und dem Ursprung der Zellen (myeloisch oder lymphatisch). Die gewonnenen Daten legen nahe, daß eine gleichzeitige Kombinationstherapie von Cladribin und Gemcitabin nicht zu einer Verbesserung der klinischen Effektivität führt.

In vielen Standardregimes werden Purin- und Pyrimidinanaloga zur Verbesserung der klinischen Effektivität miteinander kombiniert. Untersucht wurde bisher nur der Metabolismus der Standardtherapieschemata. Das Ziel dieser Arbeit bestand nun darin die Effektivität auf die Induktion der Apoptose, auf die Zellproliferation, auf den Zusammenbruch der Mitochondrienmembranpotentials und auf die Expression apoptoserelevanter Proteine zu analysieren. Die Hemmung der Zellproliferation und die Induktion der Apoptose sind die Hauptmechanismen der Zytotoxizität der antineoplastisch wirksamen Agenzien.⁶⁵ Daher wurde hier analysiert, ob Ara-C in Kombination mit Purinanaloga einen synergistischen oder antagonistischen Effekt auf die Zellproliferation und auf die Induktion der Apoptose in AML Zelllinien (HL 60 und HEL) ausübt. Daneben wurden die Effekte der Kombination von Ara-C mit Bendamustin, einem neuen bifunktionellen Agenz mit alkylierender Aktivität und mit den Eigenschaften der Purinanaloga, geprüft. Die Ergebnisse zeigen, daß Ara-C kombiniert mit Fludarabin oder Bendamustin sowohl zu antagonistischen Effekten auf die Hemmung der Zellproliferation, auf die Induktion der Apoptose als auch auf die Ruptur der Mitochondrienmembran führen, unabhängig von einer simultanen oder konsekutiven Applikation (Purinanaloga vor Ara-C), im Gegensatz zur Kombination von Cytarabin mit Cladribin. Während der Induktion der IC 50 Levels der Apoptose, konnte weder bei den antagonistischen noch bei den synergistischen Zytostatikakombinationen ein spezifisches Expressionsmuster der Apoptose assoziierten Proteine, wie der pro- oder antiapoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern, der Exekutionscaspasen, der IAPs, des proapoptotischen PAR-4, PARP oder p53, beobachtet werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, daß die Effektivität der Medikamentenkombinationen Ara-C plus Purinanaloga abhängig ist von dem gewählten Purinanalogon, wohingegen die Inkubationsbedingungen (gleichzeitig oder sequentiell) oder die Dosiseskalation keine Rolle spielen.

8. Summary

The purine analogues cladribine and fludarabine, as well as the pyrimidine analogues cytarabine and gemcitabine are essential compounds in the treatment of lymphoproliferative and hematologic diseases. Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis are the major mechanisms of cytotoxic agents to cause tumor cell death. Several clinical trials demonstrated the clinical activity of nucleoside analogues. The rationale for the combination of established drugs with new drugs is the achievement of additive or synergistic effects resulting in an increased clinical efficacy. 2-CdA is active as a single agent in the treatment of low-grade lymphomas. Chow et al analyzed the induction of apoptosis by 2-CdA alone and in combination with other drugs in peripheral lymphocytes. They showed that cladribine as a single agent increased the rate of apoptosis in a dose dependent manner. Here the results were supported by HPLC analysis of the intracellular levels of 2-CdA nucleotides in relation to the escalated dosages. The results showed, that the intracellular phosphorylation of cladribine did significantly increase in his active metabolites with increasing concentrations of the drug and increasing incubation time. It seems reasonable to evaluate whether a lower dose of 2-CdA used in combination with other agents is able to achieve higher clinical efficacy than higher doses of cladribine as a single agent. Therefore, the combination of 2-CdA with the new pyrimidine analogue gemcitabine (dFdC) was tested. Gemcitabine demonstrated promising activity against human myeloid and lymphoid leukemic cells. It is a modulator of the metabolism other nucleosides, which are phosphorylated by the deoxycytidine kinase. The combination of gemcitabine with cladribine in two myeloid (HEL, HL 60) and two lymphatic (JURKAT, HUT 78) cell lines was investigated using different incubation conditions (simultaneous and consecutive). The influence of dFdC on the level of intracellular metabolites of 2-CdA was studied using the HPLC. The combination showed an antagonistic effect when both drugs applied simultaneously. This antagonism was reduced by consecutive application, independent from the incubation time and the cell line (myeloid or lymphoid). The data suggest that the simultaneous combination therapy with cladribine and gemcitabine may not improve the clinical efficacy. In several standardized regimes purine – and pyrimidine analogues are combined to improve the clinical efficacy. Therefore, I studied whether Ara-C in combination with the purine analogues exerts synergistic or antagonistic effects on cell proliferation, phosphatidylserine exposure and disruption of mitochondrial membrane potential (MMP) as well as on the expression levels of the apoptosis-related proteins in the AML cell lines HL 60 and HEL. Furthermore, effects of the combination of Ara-C with bendamustine, a new bifunctional agent with alkylating activity and a purine nucleus, was investigated. Assessment by

combination index analysis showed that Ara-C combined with fludarabine or bendamustine exhibited additive to antagonistic effects in inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis as well as on disruption of mitochondrial membrane potential, independent of a simultaneous or consecutive (purine analogues before Ara-C) incubation schedule. In contrast, the combination of Ara-C with 2-CdA exclusively yielded synergistic effects. While inducing IC₅₀ levels of apoptosis neither the antagonistic nor the synergistic drug combinations caused a specific expression pattern of apoptosis-associated proteins such as the pro- or antiapoptotic Bcl-2 family members, executioner caspases, IAPs (inhibitor of apoptosis proteins), proapoptotic Par-4, PARP, or p53. In conclusion, here are demonstrated that the in vitro efficacy of drug combinations containing Ara-C and purine analogues depends on the purine analogue applied, whereas incubation schedules or escalating dosages do not contribute to the synergistic effects.

9. Literatur:

1. Galmarini CM, Mackey JR, Dumontet C. Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. *Leukemia*. 2001;15:875-890.
2. Green DR. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell*. 1998;94:695-698.
3. Zimmermann KC, Green DR. How cells die: apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108:S99-103.
4. Robak T, Wrzesien-Kus A, Lech-Maranda E, Kowal M, Dmoszynska A. Combination regimen of cladribine (2-chlorodeoxyadenosine), cytarabine and G-CSF (CLAG) as induction therapy for patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2000;39:121-129.
5. Santini V, D'Ippolito G, Bernabei PA, Zoccolante A, Ermini A, Rossi-Ferrini P. Effects of fludarabine and gemcitabine on human acute myeloid leukemia cell line HL 60: direct comparison of cytotoxicity and cellular Ara-C uptake enhancement. *Leuk Res*. 1996;20:37-45.
6. Gandhi V, Estey E, Keating MJ, Chucrallah A, Plunkett W. Chlorodeoxyadenosine and arabinosylcytosine in patients with acute myelogenous leukemia: pharmacokinetic, pharmacodynamic, and molecular interactions. *Blood*. 1996;87:256-264.
7. Gandhi V, Estey E, Keating MJ, Plunkett W. Fludarabine potentiates metabolism of cytarabine in patients with acute myelogenous leukemia during therapy. *J Clin Oncol*. 1993;11:116-124.
8. Gandhi V, Plunkett W. Modulatory activity of 2',2'-difluorodeoxycytidine on the phosphorylation and cytotoxicity of arabinosyl nucleosides. *Cancer Res*. 1990;50:3675-3680.
9. Gandhi V, Kemena A, Keating MJ, Plunkett W. Fludarabine infusion potentiates arabinosylcytosine metabolism in lymphocytes of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*. 1992;52:897-903.
10. Gandhi V, Plunkett W. Modulation of arabinosyl nucleoside metabolism by arabinosyl nucleotides in human leukemia cells. *Cancer Res*. 1988;48:329-334.
11. Green DR, Beere HM. Apoptosis. Gone but not forgotten. *Nature*. 2000;405:28-29.
12. Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol*. 1999;17:2941-2953.
13. Reed JC. Caspases and cytokines: roles in inflammation and autoimmunity. *Adv Immunol*. 1999;73:265-299.
14. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998;281:1309-1312.
15. Green DR. Apoptosis. Death deceiver. *Nature*. 1998;396:629-630.

16. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998;281:1312-1316.
17. Kay AC, Saven A, Carrera CJ, Carson DA, Thurston D, Beutler E, Piro LD. 2-Chlorodeoxyadenosine treatment of low-grade lymphomas. *J Clin Oncol*. 1992;10:371-377.
18. Albertioni F, Lindemalm S, Reichelova V, Pettersson B, Eriksson S, Juliusson G, Liliemark J. Pharmacokinetics of cladribine in plasma and its 5'-monophosphate and 5'-triphosphate in leukemic cells of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*. 1998;4:653-658.
19. Arner ES. On the phosphorylation of 2-chlorodeoxyadenosine (CdA) and its correlation with clinical response in leukemia treatment. *Leuk Lymphoma*. 1996;21:225-231.
20. Piro LD, Carrera CJ, Beutler E, Carson DA. 2-Chlorodeoxyadenosine: an effective new agent for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1988;72:1069-1073.
21. Beutler E. Cladribine (2-chlorodeoxyadenosine). *Lancet*. 1992;340:952-956.
22. Kristensen J, Nygren P, Liliemark J, Fridborg H, Killander A, Simonsson B, Oberg G, Larsson R. Interactions between cladribine (2-chlorodeoxyadenosine) and standard antileukemic drugs in primary cultures of human tumor cells from patients with acute myelocytic leukemia. *Leukemia*. 1994;8:1712-1717.
23. Kornblau SM, Gandhi V, Andreeff HM, Beran M, Kantarjian HM, Koller CA, O'Brien S, Plunkett W, Estey E. Clinical and laboratory studies of 2-chlorodeoxyadenosine +/- cytosine arabinoside for relapsed or refractory acute myelogenous leukemia in adults. *Leukemia*. 1996;10:1563-1569.
24. Aleskog A, Larsson R, Hoglund M, Sundstrom C, Kristensen J. Evaluation of purine and pyrimidine analogues in human tumor cells from patients with low-grade lymphoproliferative disorders using the FMCA. *Eur J Haematol*. 1999;62:293-299.
25. Robak T, Blasinska-Morawiec M, Blonski JZ, Dmoszynska A. 2-Chlorodeoxyadenosine (cladribine) in the treatment of elderly patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1999;34:151-157.
26. Bernell P, Ohm L. Promising activity of gemcitabine in refractory high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol*. 1998;101:203-204.
27. Bouffard DY, Momparler RL. Comparison of the induction of apoptosis in human leukemic cell lines by 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) and cytosine arabinoside. *Leuk Res*. 1995;19:849-856.

28. Grunewald R, Kantarjian H, Du M, Faucher K, Tarassoff P, Plunkett W. Gemcitabine in leukemia: a phase I clinical, plasma, and cellular pharmacology study. *J Clin Oncol.* 1992;10:406-413.
29. Grunewald R, Kantarjian H, Keating MJ, Abbruzzese J, Tarassoff P, Plunkett W. Pharmacologically directed design of the dose rate and schedule of 2',2'-difluorodeoxycytidine (Gemcitabine) administration in leukemia. *Cancer Res.* 1990;50:6823-6826.
30. Boos J. A simple isocratic ion-pair high-performance liquid chromatographic determination of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine 5'-triphosphate for intracellular drug-monitoring and in vitro incubation assays. *J Pharm Biomed Anal.* 1991;9:47-52
31. Chow KU, Boehrer S, Geduldig K, Krapohl A, Hoelzer D, Mitrou PS, Weidmann E. In vitro induction of apoptosis of neoplastic cells in low-grade non-Hodgkin's lymphomas using combinations of established cytotoxic drugs with bendamustine. *Haematologica.* 2001;86:485-493.
32. Schwaenen C KT, Bergmann L. Bendamustine in the treatment of low-grade Non-Hodgkin lymphomas. *Onkologie.* 2000;23: 318-324
33. Chou TC, Motzer RJ, Tong Y, Bosl GJ. Computerized quantitation of synergism and antagonism of taxol, topotecan, and cisplatin against human teratocarcinoma cell growth: a rational approach to clinical protocol design. *J Natl Cancer Inst.* 1994;86:1517-1524.
34. Chou TC. Assessment of synergistic and antagonistic effects of chemotherapeutic agents in vitro. *Contrib Gynecol Obstet.* 1994;19:91-107
35. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* 1994;84:1415-1420.
36. van Engeland M, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry.* 1996;24:131-139.
37. Gandhi V, Robertson LE, Keating MJ, Plunkett W. Combination of fludarabine and arabinosylcytosine for treatment of chronic lymphocytic leukemia: clinical efficacy and modulation of arabinosylcytosine pharmacology. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1994;34:30-36
38. Chow KU, Rummel MJ, Weidmann E, Ries J, Jantschke P, Boehrer S, Pourebrahim F, Napieralski S, Stein J, Martin H, Hoelzer D, Mitrou PS. Induction of apoptosis by 2-chloro-2'-deoxyadenosine (2-CdA) alone and in combination with other cytotoxic drugs: syn-

ergistic effects on normal and neoplastic lymphocytes by addition of doxorubicin and mitoxantrone. *Leuk Lymphoma*. 2000;36:559-567.

39. Chow KU, Ries J, Weidmann E, Pourebrahim F, Napieralski S, Stieler M, Boehrer S, Rummel MJ, Stein J, Hoelzer D, Mitrou PS. Induction of apoptosis using 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) in combination with antimetabolites or anthracyclines on malignant lymphatic and myeloid cells. Antagonism or synergism depends on incubation schedule and origin of neoplastic cells. *Ann Hematol*. 2000;79:485-492.

40. Hoffman M, Xu JC, Lesser M, Rai K. Cytotoxicity of 2-chlorodeoxyadenosine (cladribine, 2-cdA) in combination with other chemotherapy drugs against two lymphoma cell lines. *Leuk Lymphoma*. 1999;33:141-145.

41. Reichelova V, Albertioni F, Liliemark J. Determination of 2-chloro-2'-deoxyadenosine nucleotides in leukemic cells by ion-pair high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1996;682:115-123.

42. Avery TL, Rehg JE, Lumm WC, Harwood FC, Santana VM, Blakley RL. Biochemical pharmacology of 2-chlorodeoxyadenosine in malignant human hematopoietic cell lines and therapeutic effects of 2-bromodeoxyadenosine in drug combinations in mice. *Cancer Res*. 1989;49:4972-4978.

43. Begleiter A, Verburg L, Ashique A, Lee K, Israels LG, Mowat MR, Johnston JB. Comparison of antitumor activities of 2-chlorodeoxyadenosine and 9-beta- arabinosyl-2-fluoroadenine in chronic lymphocytic leukemia and marrow cells in vitro. *Leukemia*. 1995;9:1875-1881.

44. Betticher DC, von Rohr A, Ratschiller D, Schmitz SF, Egger T, Sonderegger T, Herrmann R, Kroner T, Zulian GB, Cavalli F, Fey MF, Cerny T. Fewer infections, but maintained antitumor activity with lower-dose versus standard-dose cladribine in pretreated low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 1998;16:850-858.

45. van Moorsel CJ, Veerman G, Bergman AM, Guechev A, Vermorken JB, Postmus PE, Peters GJ. Combination chemotherapy studies with gemcitabine. *Semin Oncol*. 1997;24:S7-17-S17-23.

46. Maranda E, Szmigielska A, Robak T. Additive action of gemcitabine (2',2'-difluorodeoxycytidine) and 2-chlorodeoxyadenosine on murine leukemias L1210 and P388. *Cancer Invest*. 1999;17:95-101

47. Schirmer M, Stegmann AP, Geisen F, Konwalinka G. Lack of cross-resistance with gemcitabine and cytarabine in cladribine-resistant HL60 cells with elevated 5'-nucleotidase activity. *Exp Hematol*. 1998;26:1223-1228.

48. Gruber J, Geisen F, Sgonc R, Egle A, Villunger A, Boeck G, Konwalinka G, Greil R. 2',2'-Difluorodeoxycytidine (gemcitabine) induces apoptosis in myeloma cell lines resistant to steroids and 2-chlorodeoxyadenosine (2-CdA). *Stem Cells*. 1996;14:351-362.

49. Kantarjian HM, Estey EH, Keating MA. New chemotherapeutic agents in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1996;10 Suppl 1:S4-6.

50. Seymour JF, Grigg AP, Szer J, Fox RM. Cisplatin, fludarabine, and cytarabine: a novel, pharmacologically designed salvage therapy for patients with refractory, histologically aggressive or mantle cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer*. 2002;94:585-593.

51. Vidarsson B, Abonour R, Williams EC, Woodson RD, Turman NJ, Kim K, Mosher DF, Wiersma SR, Longo WL. Fludarabine and cytarabine as a sequential infusion regimen for treatment of adults with recurrent, refractory or poor prognosis acute leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2001;41:321-331.

52. Seymour JF, Huang P, Plunkett W, Gandhi V. Influence of fludarabine on pharmacokinetics and pharmacodynamics of cytarabine: implications for a continuous infusion schedule. *Clin Cancer Res*. 1996;2:653-658.

53. Russo D, Pricolo G, Michieli M, Michelutti A, Raspadori D, Bertone A, Marin L, Pierri I, Bucalossi A, Zuffa E, De Vivo A, Mazza P, Gobbi M, Lauria F, Zaccaria A, Baccarani M. Fludarabine, arabinosyl cytosine and idarubicin (FLAI) for remission induction in poor-risk acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2001;40:335-343.

54. Schwanen C, Hecker T, Hubinger G, Wolfle M, Rittgen W, Bergmann L, Karakas T. In vitro evaluation of bendamustine induced apoptosis in B-chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2002;16:2096-2105.

55. Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Suzuki K, Ichikawa A, Furukawa Y, Bai L, Kon K. In vitro cytotoxic effects of fludarabine (2-F-ara-A) in combination with commonly used antileukemic agents by isobologram analysis. *Leukemia*. 2000;14:379-388.

56. Tosi P, Pellacani A, Zinzani PL, Magagnoli M, Visani G, Tura S. In vitro study of the combination gemcitabine + fludarabine on freshly isolated chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica*. 1999;84:794-798.

57. Schwaenen C, Karakas T, Bergmann L. Bendamustine in the treatment of low-grade Non-Hodgkin Lymphomas. *Onkologie*. 2000; 23:318-324

58. Gebrauchs- und Fachinformation Janssen Cilag

59. Cladribin (2-CdA), Pharmakolog. Profil und klein. Anwendung, Kath.et al

60. Fachinformation der Firma Lilly

61. Fachinformation der Firma Cell Pharm GmbH

62. Fachinformation der Firma Pharmacia und Upjohn
63. Fachinformation der Firma Schering
64. Staib P, Dimski T, Diehl V, Schinköthe T. Enhancing the ara-C metabolism by fludarabine as proposed for protocols like Ida-FLAG is not consistently detectable in AML-cells tested in-vitro, Abstract, DGHO 2002
65. Chow KU, Boehrer S, Napieralski S, Nowak D, Knau A, Hoelzer D, Mitrou PS, Weidmann E. In AML cell lines Ara-C combined with purine analogues is able to exert synergistic as well as antagonistic effects on proliferation, apoptosis and disruption of mitochondrial membrane potential. Leuk Lymphoma. 2003; 44:165-173.

10. Schriftliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Untersuchungen zum Metabolismus und zur Apoptoseinduktion von Purinanaloga und Pyrimidinanaloga in myeloischen und lymphatischen Zellen“

Im hämatologischen-immunologischen Labor der Universitätsklinik Frankfurt am Main

unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. P.S. Mitrou

mit Unterstützung durch Dr. K.U. Chow

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Ann Hematol 2000 79:485-492

Leukemia and Lymphoma 2000, Vol. 36(5-6), pp. 559-567

Leukemia and Lymphoma 2003, Vol. 44(1), pp. 165-173

Kahl am Main, den 10.05.03


Simone Napieralski

11. Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN:

Name: Simone Napieralski
Adresse: Theodor-Storm-Str. 16a
93051 Regensburg
Geburtstag: 26. März 1974
Geburtsort: Offenbach am Main

SCHULAUSBILDUNG:

1980 – 1984 Grundschole am Bürgerhaus, Rodgau
1984 – 1986 Georg-Büchner-Schole (Förderstufe), Rodgau
1986 – 1990 Georg-Büchner-Schole (Gymnasium), Rodgau
1990 – 1993 Claus-von-Stauffenberg-Gymnasium, Rodgau
Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife

PRAKTIKAS:

September 1993 bis Krankenpflegepraktikum, Kreiskrankenhaus
November 1993 Seligenstadt
Dezember 1993 bis Freiwilliges soziales Jahr, Kinder -und Jugendheim
November 1994 für schwer erziehbare Jugendliche Kiedrich, Rheingau
November 1994 bis Praktikum Architekturbüro Trigon, Darmstadt
März 1995

UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG:

SS 1995 – WS 1996/97 Vorklinisches Studium an der Johann Wolfgang Goethe- U-
niversität Frankfurt am Main
SS 1997 – WS 1999/00 Klinisches Studium an der Johann Wolfgang Goethe- Uni-
versität Frankfurt am Main
Oktober 2000 bis Praktisches Jahr an der Johann Wolfgang Goethe-
Oktober 2001 Universität Frankfurt am Main

PRAKTISCHE ERFAHRUNGEN:

August 1997 Famulatur, allgemeinmedizinische Praxis Dr.med.E.Albert,
Bamberg
September 1998 Famulatur, Hämatologie/Onkologie, Zentrum der Inneren
Medizin III, Universitätsklinik Frankfurt am Main
September 1999 Auslandsfamulatur, Kinderheilkunde, Bezirkskrankenhaus
Nr.1 in Ekaterinburg, Rußland
März/April 2000 Famulatur, Hämatologie/Onkologie, Zentrum der Inneren
Medizin III, Universitätsklinik Frankfurt am Main

WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT:

Juni 1998 bis	Arbeit im hämatologischen-immunologischen Labor der
Juni 2001	Universitätsklinik Frankfurt am Main

STUDIENBEGLEITENDE TÄTIGKEITEN:

Mai 1995 bis	Studienbegleitende Tätigkeit, internistische
Oktober 1995	Gemeinschaftspraxis, Rodgau
März 1996 bis	Studienbegleitende Tätigkeit, PSA Finance GmbH,
Februar 2000	Neu-Isenburg
Februar 2000 bis	Wissenschaftliche Mitarbeit im hämatologischen /
Juni 2001	onkologischen Labor, Prof. Dr. med. Mitrou,
	Universitätsklinikum Frankfurt am Main

BERUFLICHE TÄTIGKEITEN:

Dezember 2001 bis	Tätigkeit als AiP (Rotationsassistentin) auf einer
April 2002	internistischen Station mit Schwerpunkt Gastroenterolo-
	gie/Infektiologie/Endokrinologie bei Herrn Prof. Dr. med.
	Schölmerich, Uniklinikum Regensburg
April 2002 bis	Tätigkeit als AiP auf einer internistischen Station mit Schwer-
Jetzt	punkt Hämatologie/Onkologie bei Herrn Prof. Dr. med.
	Andreesen, Uniklinikum Regensburg

Kahl am Main, den 10. Mai 2003



12. Danksagung

Für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit und für die stete Unterstützung möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. P.S. Mitrou, herzlich danken.

Meinem Laborleiter, Herrn PD Dr. med. E. Weidmann, danke ich für die wohlwollende Begleitung meiner Experimente und zahlreicher konstruktiver Vorschläge.

Der Betreuer meiner Doktorarbeit, Herr Dr. med. K.U. Chow, stand mir als Ansprechpartner in allen Lebenslagen zur Seite. Des weiteren danke ich ihm für seine schier unerschöpfliche Geduld, die er bei all meinem Tun aufbringen musste.

Ferner danke ich meinen Mitdoktoranden, ohne deren tatkräftige Unterstützung die vorliegende Arbeit so nicht möglich gewesen wäre. Besonderer Dank gilt Daniel Sommerlad, der mir vor allem beim schriftlichen Teil mit Rat und Tat zur Seite stand.

Für die Hilfsbereitschaft und die anregenden Diskussionen danke ich allen Mitarbeitern des hämatologisch-immunologischen Labors, insbesondere Herrn Bernd Schneider und Dipl.-Biol. Andrea Knau.

Viele andere haben Anteil an der Fertigstellung dieser Arbeit. Hier danke ich besonders meiner Familie für ihre Unterstützung. Einem Menschen gebührt außerordentlicher Dank, meinem Freund Martin Freihoff, der während dieser Zeit immer für mich da war.

Diese Arbeit ist meiner langjährigen Freundin Sandra Steinert gewidmet. Wir wollten einst das Studium zusammen durchstehen, sie hat sich jedoch für einen anderen Weg entschieden, für welchen ich ihr viel Glück wünsche.